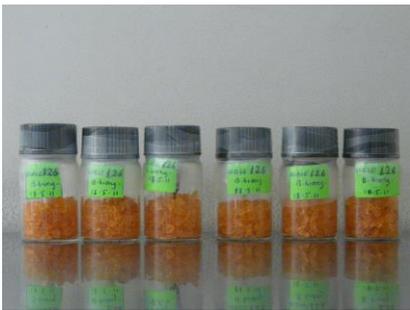


MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS



**Hilda Gómez Ramírez
Anny Zapata Granja
Enrique Torres Del Aguila
Martín Tenorio Cantoral**

2014

CONTENIDO

	Páginas
INTRODUCCIÓN	5
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	6
Características de los principales hongos entomopatógenos	6
<i>Beauveria bassiana</i>	6
<i>Lecanicillium lecanii</i>	7
<i>Metarhizium anisopliae</i>	7
<i>Isaria fumosorosea</i>	8
<i>Hirsutella thompsonii</i>	8
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	8
Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos	9
Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto	9
Germinación de la conidia	10
Penetración del integumento	10
Multiplicación el hongo en el hemocele	10
Producción de toxinas	10
Muerte del insecto	10
Colonización	10
Emergencia	11
Esporulación	11
Diseminación	11
Mecanismo de acción de <i>P. chlamydosporia</i>	12
PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	12
PRODUCCIÓN SEMI INDUSTRIAL	12
Producción	13
Aislamiento de hongos entomopatógenos	13
Aislamiento directo	13
Preparación de la cámara húmeda	13
Cultivo monoespórico	14
Conservación del cepario	14
Cepario de conservación	14
Conservación en sílica gel	14
Cepario de producción	15
Cultivos puros	15
Reactivación de la cepa	16
PRODUCCION MASIVA	16
1º Fase	16
Preparación del medio líquido	16
Inoculación e incubación del medio líquido	17
Frascos erlenmeyer	17
Biofermentador	17

2º Fase	17
Método de producción en bolsas	17
Preparación del sustrato	17
Inoculación del sustrato con el medio líquido	18
De frascos erlenmeyer	18
De biofermenador	18
Incubación del sustrato	18
Secado	19
Método de producción en bandejas	19
Preparación de medio líquido	19
Inoculación e incubación	19
Preparación sustrato sólido	20
Inoculación	20
Incubación en bandejas	20
Secado del hongo entomopatógeno	20
Extracción de conidias	20
Cosecha del hongo entomopatógeno seco	21
Conservación del hongo entomopatógeno o producto final	21
Control de calidad	21
Control de contaminantes	21
Bacterias	22
Fusarium	22
Penicillium	22
Aspergillus	22
Protozoarios	22
Ácaros	22
Control de calidad del producto final	23
Recuento directo de conidias	23
Cámara de Neubauer	23
Porcentaje de germinación o viabilidad	24
Pureza	24
Patogenicidad o virulencia	24
ANEXO	26
MEDIOS DE CULTIVO	26
Medios sólidos	26
Agar Agua (AA)	26
Papa Dextrosa Agar (PDA)	26
Papa Dextrosa Agar Levadura de cerveza (PDAL)	27
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	27
Papa Zanahoria Agar (PZA)	27
Agar Melaza Levadura (AML)	28
Solución antibiótica	28
Agua destilada estéril	28
Medios líquidos	28
Papa Dextrosa (PD)	28
Papa Dextrosa Levadura (PDL)	29

Papa hojuelas de papa Dextrosa (PHD)	29
Caldo Arroz (CA)	29
Medios de montaje	30
Azul de lactofenol	30
Solución Tween	30
CONSERVACION DE CEPAS EN SILICA GEL	30
Esterilización del Sílica Gel	30
Suspensión e inoculación del hongo	30
TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN	31
Metal	31
Calor seco u horno de esterilización	31
Autoclave	32
Puntos para recordar cuando se utiliza la autoclave	32
Uso de la autoclave	32
SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	32
Vestimenta	33
Riesgos biológicos	33
Ventajas y desventajas de los microorganismos	33
Recomendaciones para el empleo de hongos entomopatógenos	33
Procedimiento para la preparación y uso de hongos entomopatógenos	34
Procedimiento para la preparación y uso de <i>P. chlamydosporia</i>	35
Precauciones al aplicar hongos entomopatógenos	36
BIBLIOGRAFIA	36

INTRODUCCION

Los inconvenientes que presenta el control químico se han potenciado en los últimos años por el cambio en los sistemas de cultivo, monocultivos, explotaciones intensivas, etc., todo esto unido a una mayor conciencia social ante el enorme deterioro medioambiental debido a la utilización masiva de compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativo.

La aplicación de métodos biológicos para el control de insectos plaga que afectan a diversos cultivos, implica la búsqueda de microorganismos entomopatógenos eficaces, así como el desarrollo de metodologías para su multiplicación masiva, con el fin de producir biopreparados a bajo costo, los cuales puedan ser accesibles a la mayoría de los agricultores.

En la naturaleza existe una gran diversidad de microorganismos entomopatógenos, que afectan a una serie de insectos plaga reduciendo sus poblaciones. Entre estos microorganismos se encuentran hongos, bacterias, virus y nematodos, muchos de los cuales son manipulados y reproducidos masivamente para ser utilizados comercialmente en el control de plagas agrícolas, desarrollándose así el concepto de control microbioal

Uno de los componentes del control microbioal, es el uso de hongos entomopatógenos, los cuales causan enfermedades en los insectos, siendo muchos de ellos utilizados exitosamente en programas de manejo de plagas.

Aunque muchos microorganismos pueden ser efectivos para el control de plagas no todos pueden ser utilizados como agentes de control microbioal, para que estos sean usados como agentes de control biológico tienen que ser seguros para los seres humanos, genéticamente estables, no patogénicos a los cultivos, eficaces contra un amplio rango de insectos plaga, compatibles con las medidas culturales, fáciles de usar y que tenga una relación beneficio costo favorable para el agricultor.

La utilización de microorganismos benéficos como hongos entomopatógenos, involucra una serie de procesos para su producción masiva, desde la preparación del materiales y medios de cultivo, así como técnicas de asepsia para evitar contaminantes, cuyo objetivo principal es la obtención de material que, una vez aplicado en campo, actúe directamente como el estado más infectivo del microorganismo o posibilite la formación de ese estado en el campo.

Este manual tiene como objetivo describir en forma detallada y simple todos los procesos para la obtención de un producto eficiente para ser utilizados en el control de plagas agrícolas.

HONGOS ENTOMOPATOGENOS

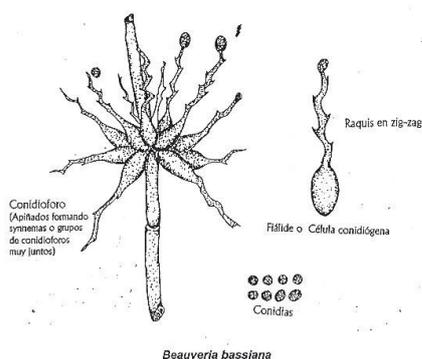
Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga, encontrándose presentes en forma natural en el medio ambiente, en el suelo, en restos de cultivos, sobre los cadáveres de insectos, obteniendo su nutrición de otros organismos o de materia orgánica.

Los hongos entomopatógenos más importantes utilizados en el control de insectos plaga, son *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *Hirsutella thompsonii*. Estos hongos pertenecen a la clase Deuteromycete, orden Moniliales, familia Moniliaceae, las cuales afectan a una serie de insectos plaga de diferentes órdenes que causan daños en cultivos de importancia económica.

Así mismo, se describe la producción de *Pochonia chlamydosporia*, un hongo nematófago que se utiliza en campo para el control de nematodos como *Meloidogyne incognita* y otros nematodos fitopatógenos que afectan a diversos cultivos.

CARACTERISTICAS DE LOS PRINCIPALES HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin



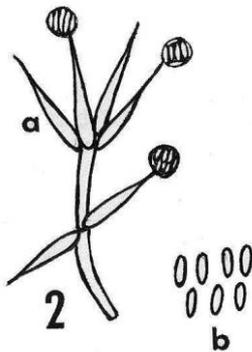
Este hongo ha sido aislado de más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de cultivos de importancia económica (Alves, 1998). La fructificación está constituida por células conidiógenas que forman conidias sucesivas en un raquis que se desarrolla en forma de zig zag. Esta fructificación ocurre como synemata o conjunto de células conidiógenas unidas.

En nuestro país esta especie de hongo se utiliza para el control de plagas como la "broca del café" (*Hypothenemus hampei*), "gorgojo negro del plátano" (*Cosmopolites sordidus*), "palomillas de la col" (*Plutella xylostella*, *Hellula undella*), pulgones, arañas rojas. Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo.



Características: Colonias blancas que se vuelven crema, amarillo pálido, incoloras al reverso, amarillas o rojizas, en medio Papa –Dextrosa – Agar (PDA) o Agar Papa Dextrosa Levadura de Cerveza (PDA-LC) presentan aspecto más pulverulento de blanco a crema, abundante esporulación.

***Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & W. Gams (= *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas**



a) Fiálides b) Conidias

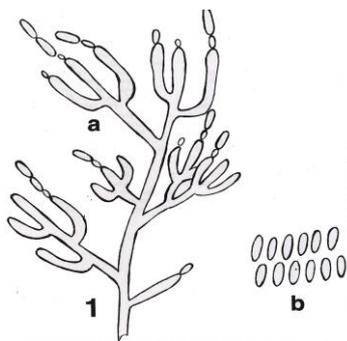
Presenta micelio tabicado, conidioforos simples o verticilados, más anchos en la base y adelgazándose hacia los extremos, en donde se encuentran las conidias agrupadas en cabezuelas, rodeados de una sustancia mucilaginosa, unicelulares, hialinos, forma cilíndricos a ovoides. Este hongo cubre con un micelio de color blanco a sus hospederos, rodeándolo como con un halo, de allí que se le conoce con el nombre de “hongo blanco de la corona”.

En nuestro país este hongo se utiliza para controlar “moscas blancas,” *Bemisia tabaci*, *Paraleyrodes citri*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Aleurodicucs coccois*, pulgones y arañas rojas



Características: Colonias blancas o cremas, algodonosas delicadas, micelio pegado al sustrato, incoloras al reverso, amarillo pálido o amarillo oscuro a los 10 días a 25°C en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) o en Papa Dextrosa Agar (PDA)

***Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin**



a) Fiálide b) Conidia

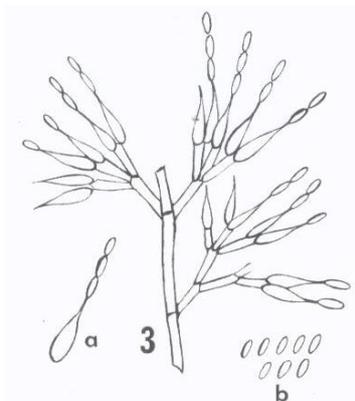
Presentan conidioforo ramificado, conidias cilíndricas a ovales que se forman en cadenas originadas en fialides. Las conidias son producidos en sucesión basipétala, estando la conidia más joven en la base de la cadena. Las conidias son blancos cuando son jóvenes, pero conforme maduran toman el color verde oscuro característico de esta especie.

En nuestro país este hongo se utiliza para el control de algunos insectos plaga como “gusanos blancos o “chacareros, “palomillas de la col (*Plutella xylostella*, *Hellula undella*)



Características Colonias de color verde que varían desde el oliváceo hasta amarillo-verde o verde oscuro. Desarrollan bien a 26 °C en Papa –Dextrosa- Agar (PDA), o en Sabouraud Dextrose Agar (SDA), o en PDA-LC.

***Isaria fumosorosea* (Wize) Brown / Smith**



a) Fialide b) Conidias

Presenta micelio tabicado, conidioforos verticilados, células conidiógenas o fialides subglobosas con un cuello estrecho donde nacen las conidias ovoides a subglobosas, hialinas unicelulares, desarrollándose en sucesión basipétala. En medio de cultivo presentan micelio levantado de color blanco, tornándose rosado liláceo cuando madura.

En nuestro país este hongo se utiliza para controlar principalmente las “moscas blancas” *Bemisia tabaci* y *Bemisia argentifolii*



Características: colonias de color lila claro a lila oscuro, desarrollo rápido y levantado con aspecto polvoriento granular en medio de Agar Extracto de Malta (MEA) o Papa Dextosa Agar (PDA), o en el medio SDA.

***Hirsutella thompsonii* Fisher**

Presentan micelio septado, fino e hialino. Las células conidiógenas es una fialide gris, originándose en las partes laterales de la hifa. Las conidias se producen solitarios o en grupos de dos o tres, son globosos y de superficie verrucosa.



Características: Colonias de apariencia afelpada, de color gris a gris oliváceo, en ocasiones blanco. Desarrollan bien a 26 °C en Papa –Dextrosa- Agar (PDA) y Sabouraud Dextrose Agar (SDA).

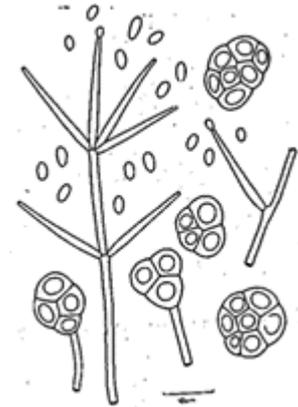
En nuestro país este hongo se utiliza para controlar al “ácaro de tostado” encontrándose infectando también a otros ácaros como la “arañita roja”



***Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gam & Zare**

Es un hongo nematófago, parásito facultativo que infecta huevos de nematodos y hembras sedentarias del “nematodo del nudo”, *Meloidogyne incognita* y otros nematodos.

Presenta conidioforos erectos, con ramificación verticilada, presentando una protuberancia en forma de mazo en la punta del conidioforo que sostiene una sola espora; fialides cilíndricas de 15 – 30 μm de longitud en forma de espiral de 3 a 5. Fialosporas hialinas, de 2 - 5 x 1,5 - 2 μm de diámetro, ovoides ligeramente cilíndricas, de paredes lisas. Aleuriosporas muy comunes, que presentan de 4 a 9 celdas globulares de paredes gruesas, miden de 15 –30 x 10 a 20 μm , muriformes, ligeramente lobulados, con contenido granular, que nacen sobre ramificaciones laterales cortas de 15 – 30 μm de longitud, son muy persistentes. El micelio maduro completamente cubiertos de aleuriosporas, llegando a presentarse polvoso de color crema u ocre (Cook, R. J.; K. Bakes. 1989)



Características: Las colonias son de color blanco, con micelio sumergido. En medio de cultivo presentan micelio levantado de color blanco, tornándose rosado liláceo cuando madura.

El micelio maduro completamente cubiertos de clamidosporas, llega a presentarse polvoso de color crema u ocre.



Pochonia chlamydosporia es un hongo nematófago que se está utilizando para el control de nematodos, especialmente *Meloidogyne incognita* y otros nematodos fitopatógenos, en diversos cultivos alimenticios, convirtiéndose en una alternativa ambientalmente segura para el manejo de esta plaga.

MECANISMOS DE ACCION DE LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los hongos entomopatógenos y los insectos. En general la mayoría de los hongos de plantas y vertebrados infectan al hospedante a través de la cutícula. El contacto entre la unidad infectiva del entomopatógeno y el insecto es indispensable para el inicio del proceso infeccioso.

Las etapas en el desarrollo de la micosis son.

1. Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto

Es el contacto de la unidad infectiva del hongo o conidia con la superficie del insecto. Las responsables de esta unión son las características físicas y químicas de las superficies tanto de la conidia como de la superficie del insecto. En algunos hongos la adhesión es un proceso no específico, mientras que en otros es un proceso específico. En este proceso participan algunas glicoproteínas que sirven como un receptor específico para las conidias. Las zonas de adhesión, son las regiones intersegmentales o zonas blandas.

2. Germinación de la conidia

Es el proceso mediante el cual, la conidia o espora sobre el integumento del insecto, germina emitiendo un tubo germinativo, formando luego un apresorio con el cual se fija en la cutícula. El tubo germinativo puede ser largo o corto y en algunos casos no llega a formarse. El tiempo de germinación dependiendo de la cepa es de 12 a 20 horas.

3. Penetración del integumento

La penetración de la cutícula del insecto, ocurre como resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. En este proceso participa un mecanismo físico y otro químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerotizadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasa y quitinasas, las cuales degradan el tejido de la zona de penetración, lo que facilita la penetración física. El tiempo de penetración es de 8 a 12 horas.

4. Multiplicación del hongo en el hemocele

Una vez que el hongo llega al hemocele, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, en forma de levaduras o desarrollo por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamados blastosporas.

5. Producción de toxinas

Los hongos producen toxinas que matan al insecto, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas y matan al insecto al consumir todos sus nutrientes. Las toxinas son sustancias de baja toxicidad para mamíferos pero muy tóxicas para artrópodos, causando la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas, produciendo la degeneración de los tejidos producto de la pérdida de integridad estructural de las membranas seguida de la deshidratación de las células por pérdida de fluido, además actúan como inhibidores de las reacciones de defensa del insecto. Las toxinas producidas pueden ser enzimas, las cuales son secretadas en cantidades significativas tanto en el cuerpo del insecto como en medios de cultivo (lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas), o metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pudiendo ser afectada por diferentes factores como nutrientes, pH, temperatura, etc.

6. Muerte del insecto

La muerte del insecto infectado, ocurre generalmente antes de que el hongo colonice totalmente el hemocele del insecto, debido en gran parte a la acción de las toxinas. Con la muerte del insecto finaliza la fase parasítica y se inicia la fase saprofítica. El tiempo de la muerte depende de la cepa del hongo, del hospedante y de las condiciones ambientales.

7. Colonización

Una vez muerto el insecto, el micelio invade todos los órganos y tejidos. Después de la colonización, en la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales que impiden la descomposición del insecto manteniéndolo como una momia, también puede presentarse el cambio de color en el cadáver del insecto. El tiempo que dura la colonización es de 3 a 8 días, dependiendo de la cepa del hongo

8. Emergencia

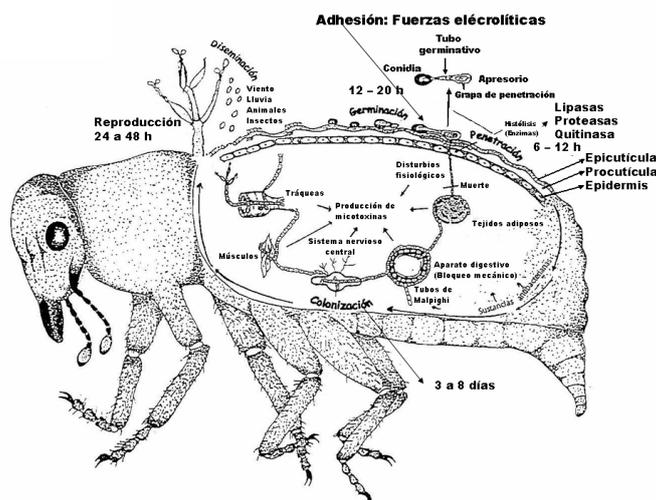
Después de muerto el insecto, si las condiciones de humedad relativa ambiental son favorables, (\geq a 90%) el hongo emerge al exterior a través de la cutícula principalmente a través de las zonas menos esclerosadas, y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones externas no son favorables, el hongo permanece en el interior del insecto, protegido por el integumento, donde puede sobrevivir por algunos meses, hasta que lleguen las condiciones favorables para su esporulación.

9. Esporulación

Cuando las hifas emergen al exterior y si las condiciones de humedad relativa son favorables, ocurre la producción de conidios o esporas en un período de 24 a 48 horas. En esta fase el insecto muerto adquiere la coloración característica del hongo involucrado.

10. Diseminación

Las conidias o esporas del hongo que son las unidades infectivas se diseminan por medio del viento, lluvia, animales, hombre, buscando nuevos hospedantes para iniciar el proceso de infección. La dispersión puede ser un proceso activo o pasivo, dependiendo de las características de la conidia y del esporangio.



Relación hongo entomopatógeno -- hospedero

Mecanismo de acción de *Pochonia chlamydosporia*

P. chlamydosporia forma una red micelial muy ramificada que permanece en estrecho contacto con la cutícula del huevo, luego el hongo produce órganos de penetración especializados, apresorios, desarrollados a partir de la hifa indiferenciada que permite la colonización de la superficie de los huevos de los nematodos. (Lopez-Llorca, 2002). El hongo causa la desintegración de la capa vitelina de la pared del huevo y una dilución parcial de la capa quitinolítica y lipídica del huevo. *P. chlamydosporia* cuando está cerca de los huevos de los nematodos impiden que eclosionen bajando las poblaciones. (Meyer 1990; Morgan –Jones, 1988),



Huevo de *M. incognita* parasitado por *P. chlamydosporia*

PRODUCCION DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

La utilización de productos a base de hongos entomopatógenos, implica una serie de acciones las cuales van a determinar la obtención de productos biológicos de alta eficiencia en la reducción de las plagas para las cuales se están utilizando. Para la obtención de estos productos biológicos se requiere producir estos hongos entomopatógenos, el cual consiste en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (conidias) en un sustrato natural. A la fecha se han evaluado diferentes sustratos como arroz, trigo, cebada, maíz, frijol y soya, siendo los que mas se utilizan el arroz y el maíz.

Existen varias metodologías para la producción masiva de hongos entomopatógenos como la producción industrial, producción semi-industrial y producción artesanal. El método desarrollado por el Laboratorio de Entomopatógenos de la SDCB del SENASA es la producción semi-industrial.

PRODUCCIÓN SEMI- ARTESANAL

La producción semi-industrial se realiza en varias fases, que van desde la obtención del cultivo puro hasta la formulación del producto. El proceso consta de dos etapas, cepario y producción masiva.

Cepario

La etapa de cepario comprende:

- Aislamiento del hongo
- Obtención del cultivo puro
- Obtención de nuevas cepas
- Mantenimiento

- Reactivación
- Conservación de cepas.
- Control de calidad

Producción

La etapa de producción comprende:

- Preparación de medio líquido
- Inoculación e incubación de medio líquido
- Preparación del sustrato
- Inoculación e incubación del sustrato
- Proceso de secado
- Conservación
- Control de calidad

1. Aislamiento de hongos entomopatógenos

Es la obtención del hongo a partir de insectos infectados, o medios artificiales como PDA (tubos de ensayo o placas de Petri), o conservados en Silica Gel. A partir del aislamiento del hongo se procede a su inoculación en un medio de cultivo para la obtención de cultivos puros. El aislamiento del hongo es el paso inicial del proceso de producción, por lo que se debe estar seguro de haber aislado el hongo correspondiente a nuestra producción, así como estar libres de contaminantes y tener un buen desarrollo.



El aislamiento puede realizarse de diferentes maneras, siendo la más común el aislamiento directo.

1.1 Aislamiento directo

Consiste en la obtención directa del hongo a partir del insecto esporulado. Esta técnica no es muy ventajosa, debido a que las muestras que se toman del insecto pueden estar sucias y acarrear problemas de contaminación en el aislamiento, siendo aconsejable, coger cuidadosamente con un asa en punta una porción pequeña del hongo, sin tocar el cuerpo del insecto y sembrarla en medio de cultivo.

Este proceso debe hacerse bajo un estereoscopio. Cuando en el insecto no se observan las estructuras del hongo se pone en cámara húmeda para estimular el desarrollo del hongo siendo más fácil su aislamiento.

1.2 Preparación de la cámara húmeda.-

Se seleccionan insectos que no muestren signos de contaminación, o que se presenten sucios, para desinfectarlos se sumerge a los insectos de 10 segundos a 3 minutos en hipoclorito de sodio al 0.05 % (dependiendo del tamaño o tipo de insecto), se enjuaga tres veces en agua destilada estéril y se ponen sobre un papel toalla l para eliminar el exceso de agua. Los insectos desinfectados se ponen en una cámara húmeda, que consiste en una placa de Petri estéril, en donde se coloca al insecto y a un costado se pone un algodón embebido en agua estéril, se sella con cinta parafilm e incuban durante 5 a 10 días a temperatura ambiente.

Las cámaras húmedas preparadas, se revisan a partir del quinto día observando al estereoscopio los insectos esporulados, con la ayuda de un asa de siembra se toma una muestra del hongo y se coloca sobre una lámina porta objeto con una gota de azul de lacto fenol, se extiende la muestra y se coloca un cubre objeto, observando el preparado al microscopio, una vez confirmada la especie que se desea aislar, se procede a sembrar en hongo por puntura en placas de Petri con medio de cultivo SDA acidificado o con antibiótico, a partir del mejor insecto esporulado. Incubar las placas preparadas durante 5 a 10 días a una temperatura de 25 ± 2 °C.

1.3 Cultivo monoespórico

Un aislamiento monoespórico es aquel que se obtiene a partir de una espora con un contenido genómico único, que corresponde a un clon genéticamente uniforme de una célula individual, con la finalidad de minimizar la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos en producción



Con el asa de siembra se extraen esporas de una placa, se siembran en 10 ml de Tween 20 al 0.1% y se realizan diluciones hasta obtener la dilución 10^{-2} .

Las placas con medio de cultivo que se utilizarán para el cultivo monoespórico, se preparan marcando unas líneas guía en forma de W en el reverso de la placa con el fin de facilitar la lectura en el microscopio. Se toma una gota de la dilución con un asa de siembra en aro y se deposita en el extremo superior de la estría, arrastrando la gota por la estría dibujada, cuidando de no levantar el asa de siembra. Las placas preparadas se incuban durante 24 horas a 25 ± 2 °C. Con la ayuda de un microscopio se ubica una espora germinada se corta el bloque de agar que contiene la espora y se lleva a un medio nutritivo con antibiótico, llevar a incubar a 25 ± 2 °C por 8 a 10 días, al cabo de este tiempo se seleccionan las colonias monoespóricas sin contaminantes y que presenten las características típicas del hongo sembrado. Los cultivos monoespóricos se conservan a 5 °C utilizándolos cuando sean convenientes.

2. Conservación del cepario

2.1 Cepario de conservación

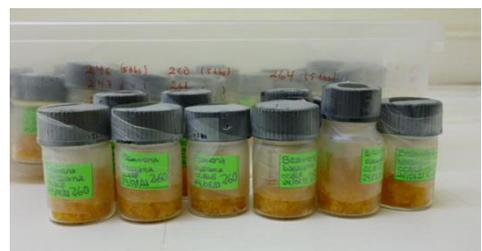
En el laboratorio, se debe mantener un cepario de conservación y otro de producción.

Las cepas o aislamientos procedentes de monocultivos, se conservan en viales o tubos con PDA o PZA a 5 a 9 °C: Otra modalidad de conservación de cepas es en **silica Gel** (color anaranjado) se fechan, anotándose el código del aislamiento.

2.2 Conservación en Sílica Gel

En una ficha aparte se anotará el nombre del patógeno, nombre de la persona que efectuó el aislamiento, lugar, fecha, colector, medio de cultivo utilizado y otros datos de interés.

El “cepario de conservación” es del primer pase del hongo. Si la conservación es en tubos con



medio de cultivo, una vez desarrollado el hongo se guardan en refrigeración a temperatura de 4° C, asegurando de esta forma una conservación hasta por un año, en que se realizará el pase a nuevos tubos, si se observa que el medio se ha secado.

Las contaminaciones ocurren con frecuencia, incluso en tubos cuidadosamente taponeados, por tanto es necesaria la asepsia para los trabajos microbiológicos en la siembra e inoculación.

Cuando se realiza un gran número de pases a medios de cultivo, ocurren cambios en las características del hongo, produciéndose también estos cambios cuando se someten a condiciones no adecuadas de pH, temperatura o cuando alguna sustancia o componente no adecuado son usados en el medio de cultivo. El pH debe oscilar entre 5 y 6. Si las cepas se conservan en tubos con medio de cultivo, no deben conservarse por más de 3 meses en refrigeración.

2.3 Cepario de producción

Los tubos de cultivo destinados al “cepario de producción o trabajo” se obtienen del cepario de conservación, estas deben tener un buen desarrollo y estar bien esporulados.

El pase de la cepa a partir de éste, se considera un segundo pase y si a éste a su vez se le da un tercer pase, se deberá reactivar la cepa nuevamente o se tomarán tubos del cepario de conservación.

2.4 Cultivos puros

Un cultivo puro es aquel en que está presente únicamente el hongo de interés sin ningún tipo de contaminantes. Los cultivos puros se obtienen a partir del reislamiento del hongo a partir del cepario de producción, el cual es sembrado en placas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA o SDA. El cultivo puro es la fuente de inóculo para iniciar el proceso de producción y es utilizado para inocular los medios líquidos.

2.5 Control de calidad

El objetivo del control de calidad en esta etapa del proceso de producción es evaluar las características de la cepa que se va a utilizar en la producción y detectar la presencia de contaminantes en los medios de cultivo para su eliminación, lo cual se realiza mediante la observación visual de la cepa y la utilización de medios de cultivo.

Debido a que en la etapa de cepario se trabaja con medios de cultivo de alto valor nutritivo, existen mayores posibilidades que ocurran el crecimiento de microorganismos no deseados, principalmente hongos y bacterias presentes en el ambiente o en otras fuentes de contaminación.

El control de calidad en la etapa de cepario debe realizarse con mucho rigor, debido a que es en esta etapa que se inicia el proceso de producción, de manera que si se selecciona incorrectamente la cepa y el cultivo puro y además existe presencia de contaminantes, esto afectará los siguientes pasos del proceso, lo que al final incide en la calidad y el rendimiento del producto final.

REACTIVACION DE LA CEPA

La reactivación del carácter de virulencia, se logra realizando los pases por su hospedante original, para lo cual se utilizan insectos de crianza en laboratorio, pudiendo utilizarse también otros insectos por su facilidad de crianza en laboratorio como *Galleria mellonella*. La reactivación se puede realizar mediante dos métodos, uno asperjando los insectos con una solución de esporas de una concentración conocida y el segundo sumergiendo los insectos en la solución de esporas. Para ambos métodos los insectos se tienen que esterilizar en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% , enjuagar por tres veces en agua destilada estéril, poner sobre un papel toalla estéril para eliminar el exceso de humedad, y asperjar los insectos o sumergirlos en la solución de esporas, acondicionándolos luego en una cámara húmeda. Incubar a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ y revisar a partir del tercer día retirando los insectos que muestren signos de infección. Los insectos que presenten mayor esporulación en menor tiempo serán utilizados para la reactivación del cepario.

PRODUCCION MASIVA

La producción masiva de los hongos entomopatógenos se realiza en dos métodos: uno en bolsas y otro en bandejas. En ambos métodos es secado para su comercialización.

La concentración de esporas o conidias es 10 veces más que por el método en bandeja que el de bolsa. El método de bandeja solo es aplicado para *B. bassiana* y *M. anisopliae*, salvo mejor parecer del laboratorio de producir estas especies por el método en bolsa. Ambos procesos se realiza en dos fases:

PRIMERA FASE

Preparación del medio líquido

Los medios líquidos utilizados para la producción masiva, varían de acuerdo a la especie de hongo entomopatógeno que se va a producir, el más común es el PD, PG (Papa Dextrosa, Papa Glucosa), CA (Caldo de Arroz) para *Pochonia*. Estos medios pueden prepararse en frascos erlenmeyer o matraces a razón de 700 ml por frasco de 1000 ml, se cubren con papel aluminio y se esteriliza a 121°C y 15 lbs (1 atm) de presión por 20 minutos. (Ver Anexo).

Otra forma de preparar el medio líquido es en biofermentadores de 20 litros, se preparan 15 litros de medio, se esterilizan en una autoclave por una hora a 121°C y 15 lbs de presión. La esterilización se realiza con los filtros, cerrando las mangueras con una pinza antes de los filtros para evitar que se mojen al momento de la esterilización



Inoculación e incubación del medio líquido.

Frascos erlenmeyer

Una vez fríos los medios líquidos, se llevan a la cámara de flujo laminar y se le agrega aproximadamente 0.1 g de cloranfenicol a granel. Se selecciona la mejor placa previamente analizada, es decir libre de contaminación, buena esporulación y morfología microscópica típica. Se agrega 10 ml de agua destilada estéril más Tween y con la ayuda de una espátula o una cucharilla flameada y enfriada con alcohol, se raspa suavemente la superficie de la placa, para soltar las esporas o conidias, se agrega 10 ml de agua destilada estéril más Tween, con una pipeta estéril se toma 5 ml de la solución y se agrega al medio líquido frío. También otra forma de inocular el medio líquido es cortar el agar y agregar un cuarto de placa por frasco de medio líquido. Terminada la siembra se cierran con su respectiva tapa estéril de papel aluminio, se cubre finalmente con cinta parafilm y se llevan a un agitador orbital a 160 rpm por 3 días a la temperatura de 24 a 28 °C



(controlar la temperatura con estufas o termoventiladores).

Biofermentador

Una vez frío el biofermentador, se lleva a la cámara de flujo laminar y se le agrega 1 ml de ácido láctico por litro de medio y 0.1 g de antibiótico por litro (cloranfenicol o sulfato de estreptomycin) y se inocula con una solución de esporas que se obtiene de una placa esporulada, la cual se prepara del mismo modo que para los frascos erlenmeyer. Se agrega todo el contenido de la placa. Una vez inoculado se quitan las pinzas y a la manguera de uno de los filtros se le coloca un motor de pecera para su agitación por 3 días, a temperatura de 24 a 28 °C



SEGUNDA FASE

MÉTODO DE PRODUCCIÓN EN BOLSAS

Preparación del sustrato

La preparación del sustrato es diferente para las especies:

- Pochonia chlamydosporia***: 800 g de arroz y 100 ml de agua blanda o destilada
- Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii* e *Hirsutella thompsonii*** 800g de arroz y 200ml de agua
- Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae***: 800 g de arroz y 200 ml de agua.

Una vez llenadas las bolsas de polipropileno, se engrapan los extremos de la bolsa previo doblez de la bolsa y se esteriliza en autoclave: 121 °C, 15 Lb de presión (1 Atmosfera), por 30 minutos, El tiempo de esterilización esta en relación conforme aumente la cantidad de bolsas (hasta 45 min con el autoclave convencional).



Precaución: Esperar que la presión baje a cero “0” antes de abrir el autoclave.

En un ambiente previamente esterilizado con luz UV por 1 hora, colocar las bolsas sobre una mesa desinfectada, resistente al calor y con ayuda de guantes de cuero resistentes al calor, se procede a descompactar el arroz, para que no se formen grumos. Las bolsas se dejan enfriar y antes de continuar con el paso siguiente de la inoculación del sustrato se debe esterilizar, nuevamente, el ambiente donde se dejaron enfriar las bolsas. (Emplear lámparas de luz ultravioleta durante 1 hora, desconectar, e ingresar a partir de 30 minutos aproximadamente).

Inoculación del sustrato con el medio líquido

De frascos erlenmeyer

Una vez frías, las bolsas con el arroz se llevan a la cámara de flujo laminar, se desinfecta el borde de cada bolsa con un algodón embebido en alcohol, se abre cuidadosamente la bolsa y se inocula con 30 ml del caldo líquido agitado. Con un frasco de medio preparado se inoculan 20 bolsas. Se cierra nuevamente la bolsa y se agita para homogenizar el inóculo con el sustrato.



Para **Pochonia**, una vez frías las bolsas se inoculan con 120 ml de caldo de arroz (Ver medio Líquido en el anexo)

De biofermentador

La siembra se realiza con una jeringa multidosificadora, utilizando:

- 30 ml para la producción en bolsas y
- 50 ml para la producción en bandejas.



Incubación del sustrato

Las bolsas inoculadas son llevadas a la sala de germinación a la temperatura de 24 a 28 °C, incubándose en oscuridad los primeros 3 días para favorecer el desarrollo del micelio. Al finalizar el tercer día encender la luz de los cuartos de incubación. Al



cuarto día de incubación, las bolsas son quebradas suavemente para favorecer la oxigenación de todo el sustrato y son dejadas 7 a 21 días hasta completar la esporulación.

En esta etapa se revisan las bolsas diariamente, eliminando las que se presenten poco homogéneas, así como las bolsas con presencia de contaminantes

Para **Pochonia**, las bolsas preparadas son selladas, se agitan para conseguir una mezcla homogénea, se fechan y se las acondiciona en la sala de incubación en forma horizontal por 21 días en oscuridad, a una temperatura de 24 °C y una HR de 53%. Al cuarto día se hacen ligeros quiebres al arroz, y luego se voltea la bolsa. A séptimo repetir esta operación e ir observando la aparición de pigmentación amarillenta, que viene a ser un indicador de formación de clamidosporas.



Secado del producto final

Con la finalidad de secar el producto, se abren las bolsas por el centro, con lo que se consigue bajar la humedad a 30 – a 35%. Otra opción más favorable para disminuir la humedad hasta 15%, es vaciar el sustrato a plásticos de polietileno o bandejas desinfectadas con alcohol, encendiendo el aire acondicionado o utilizando deshumedecedores.

MÉTODO DE PRODUCCIÓN EN BANDEJAS (*B. bassiana* y *M. anisopliae*)

En este proceso la germinación y desarrollo vegetativo del hongo se realiza en las bolsas y el proceso de colonización y esporulación se realiza en bandejas.

Preparación de medio Líquido:

Se emplea caldo Papa Dextrosa o Caldo Hojuela de papa Dextrosa (Ver Anexo).

Inoculación e incubación del medio líquido.

Se repite el procedimiento del mismo modo que para el método en bolsas. Los medios de cultivo son inoculados con aproximadamente la cuarta parte de placa con hongo y es llevado a agitación durante 3 días.

Preparación del sustrato.

La preparación del sustrato arroz es igual al procedimiento antes descrito, variando la cantidad de agua que se utiliza para humedecer el arroz, así para 1000 gramos de arroz se agrega 400 ml de agua blanda o destilada.

Inoculación del sustrato

Al medio líquido agitado durante los 3 días, se le agrega nuevamente con ayuda de una espátula aproximadamente 0.1 gramo de antibiótico cloranfenicol, agitar y agregar agua destilada estéril hasta completar 1 litro. La inoculación de las bolsas se realiza

agregando 50 ml de medio líquido por bolsa. Luego se deben agitar las bolsas y llevarlas a incubación.

Incubación

Las bolsas preparadas se incuban por 48 horas a una temperatura de 24 a 28 °C, luego se seleccionan las bolsas que presentan un buen desarrollo micelial y libres de contaminantes.

Con una tijera desinfectada con alcohol se cortan las bolsas por debajo de las grapas y se pasa el arroz con el hongo a bandejas que han sido previamente desinfectadas para lo cual las bandejas se limpian y humedecen con alcohol y se flamean con el mechero. Se extiende el arroz en las bandejas, para favorecer la colonización y esporulación del hongo y se dejan en incubación a 27 °C y 80% HR por 5 días.



Pase del arroz a bandejas Extendido del arroz

Esporulación del hongo

Secado del hongo entomopatógeno

Una vez que el hongo ha esporulado cubriendo toda la bandeja, se realiza su secado a temperaturas bajas por un periodo de 5 a 6 días, tiempo suficiente para bajar la humedad del arroz a 15% de humedad. El área de secado cuenta con aire acondicionado y se realiza ajustando la temperatura en 16 °- 20 °C.



Extracción de conidias

Consiste en separar del arroz las conidias del hongo y recolectarlas para su posterior formulación. La cosecha extracción de conidias puede realizarse en equipos mecánicos como el Mycoharvester o en forma manual utilizando tamices mas frotación, en que se cosechan pequeñas cantidades con fines de ensayos.



La conidias cosechadas son afectadas por la luz, humedad y altas temperaturas, por lo que una vez cosechado el hongo debe conservarse en refrigeración a 4 °C, para mantener su viabilidad.

Cosecha del hongo entomopatógeno seco.

El producto final es cosechado en bolsas, pesado a 800 g y sellado. El rendimiento de esporas por kilo está en función a la especie producida, pudiendo llegar a obtenerse concentraciones de 4×10^{13} a 1×10^{14} con/k (*B. bassiana*)

Para la cosecha utilizar vestuario de bioseguridad, (careta de cara completa, mameluco cuerpo completo descartable o lavable)



Conservación del hongo entomopatógeno o producto final

En ambientes provistos de temperatura de 5 °C, el producto final conserva inalterables sus características por más tiempo. Y en temperaturas de 16 – 20°C por 3 meses.

CONTROL DE CALIDAD

En la producción masiva, hay una serie de aspectos de control de calidad que se deben tomar en cuenta, como el control de contaminantes durante el proceso de producción, revisando la viabilidad, concentración o número de conidias por gramo de producto y virulencia del producto final.

1 Control de contaminantes

Uno de los aspectos más críticos de la producción masiva es asegurarse de que la contaminación del producto sea evitado a toda costa. Se considera contaminante a todo aquel tipo de microorganismo no deseado que se desarrolla en el medio de cultivo del hongo entomopatógeno. Generalmente los contaminantes siempre están presentes en el ambiente y en los materiales empleados en el laboratorio y se presentan cuando no se cumplen las normas de trabajo en el laboratorio. Aún bajos niveles de contaminación de hongos contaminantes como *Aspergillus* o *Penicillium* spp., son completamente inaceptables en el producto final.

Los contaminantes afectan al hongo que se está produciendo compitiendo con los nutrientes del medio y espacio que debería ocupar el entomopatógeno, además los contaminantes se pueden comportar como hiperparásitos, es decir se alimentan del hongo en producción, además pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento y la formación de estructuras reproductivas.

El control de contaminantes, se inicia haciendo revisiones regulares en las que se determinan la aparición de contaminantes durante el proceso de producción masiva. Este debe ser realizado en cada fase de producción, desde la evaluación del tubo o placa que se utilizará en la producción masiva, hasta el producto final una vez que el hongo ha desarrollado completamente sobre el sustrato.

Los contaminantes más comunes son:

Bacterias: Son los contaminantes mas importantes en el proceso de producción masiva, de acuerdo a la especie presentan colonias redondeadas, translúcidas de coloración amarillenta, rosada o lechosa, desarrollando muy rápido en el medio de cultivo observándose al segundo día después de sembradas las placas. Estas bacterias desarrollan también en las bolsas sembradas, las que se despiden mal olor, descomponiéndose muy rápidamente. Las bacterias más comunes son los bacilos y cocos, encontrándose también levaduras.

Fusarium: Las colonias de este hongo pueden tener diferentes coloraciones o presentar pigmentaciones en el medio en que se encuentran estas pueden ser: naranjas, rosadas, amarillas, crema, violáceas y producen dos tipos de conidias, macro y micro conidias.

Penicillium: Conidióforos largos, septados, lisos o rugosos, individuales o en sinemas, ramificado cerca del ápice en uno, dos o más verticilos, que le dan aspecto de una escoba, ramas terminadas en fiálides o células fértiles productoras de conidias, conidias producidos basipetalamente y unidas en cadenas, los conidias son globosos a elípticos, lisos o equinulados.

Aspergillus: Es un hongo patógeno al hombre por que es cancerígeno, tiene conidióforos hialinos rugosos o reticulados y con vesículas globosas, cabezuelas conidiales globosas verde o verde amarillentas, esterigma en una o dos series a veces hasta en una misma vesícula. Conidias globosos a ovals.

Protozoarios: Estos microorganismos son difíciles de diagnosticar, pudiendo encontrarse infectando a nivel de cepa. Estos microorganismos tienen comportamiento hiperparasítico pues se alimentan de los hongos bajando el rendimiento.

Ácaros: Los ácaros de los géneros *Tyrophagus* y *Tarsonemus*, son contaminantes comunes en todo laboratorio, estos invaden e infestan cultivos en tubos, placas de Petri. Se alimentan de los hongos y a menudo los infectan con diversas bacterias u otros contaminantes al deambular desde un cultivo a otro. Los ácaros son atraídos por el aroma de los hongos, siendo transportados por insectos, plantas etc.. Si se observan en placas, tubos o bolsas, estas deben eliminarse inmediatamente en la autoclave, pues estos ácaros se diseminan muy rápidamente.

Para evitar el crecimiento de bacterias se le debe de agregar al medio un antibiótico como penicilina, cloranfenicol, estreptomycin y regular el pH por medio de la adición de ácido láctico, cuando el daño por bacterias es elevado, es recomendable fumigar el lugar de trabajo con formalina o poner lámparas de luz ultravioleta que ayudan a eliminar las bacterias y hongos que se encuentran en el medio ambiente y esterilizar todo material que se utilice en el proceso de producción

La presencia de hongos contaminantes en las bolsas se detectan por ser diferentes a la forma y color típico del entomopatògeno. Cuando la contaminación es por bacterias, el entomopatògeno no logra crecer y el sustrato presenta mal olor.

Una forma de determinar la presencia de hongos y bacterias contaminantes, es poner placas de Petri con medio de cultivo SDA, abiertas dentro de la cámara de flujo laminar, sobre la superficie de las mesas, dentro de la incubadora, etc., estas placas se dejan por 30 minutos, luego se cierran y se incuban.

El mejor método de control para evitar los diversos tipos de organismos contaminantes es la asepsia e higiene general del laboratorio, limpiando diariamente los pisos, mesas, estantes, así mismo la incubadora se debe desinfectar con alcohol 70 % y luego con luz UV durante 1 hora.

2. Control de calidad del producto final

Es el proceso por el cual se determina la calidad del producto final obtenido, registrando el número de conidias por gramo de sustrato, viabilidad, pureza.

Para que el biopreparado sea considerado de buena calidad, debe reunir ciertos parámetros establecidos por organismos encargados de regular la calidad de estos productos. Estos parámetros son:

- Concentración de conidias: Determinado según las características de conidiación del hongo y en el método que se emplee para producirlo.
- Porcentaje de germinación o viabilidad : mayor o igual al 90%
- Pureza : 100%

2.1 Recuento directo de conidias

Pesar 1 g, de arroz esporulado, y agregar 10 ml de Tween 0,1%, en este caso la suspensión de conidias corresponde a 10^{-0} , mezclar homogéneamente.

Luego se realiza la dilución 10^{-1} tomando 1 ml de la bolsita a un frasquito con 9 ml de Tween 0.1%, agitar durante 30 segundos en el vórtex; y así hasta llegar a la dilución 10^{-2} .

Con una pipeta Pasteur, tomar una muestra de la última dilución y llena la cámara de Neubauer. Llevar al microscopio y proceder a contar las conidias en el cuadrante central de la cámara. Contar cinco cámaras y determinar la concentración de conidias por ml mediante la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ conidias/ml} = X \cdot 5 \cdot 10^4 \cdot ID$$

5 = N° cuadraditos contados en el cuadrante central

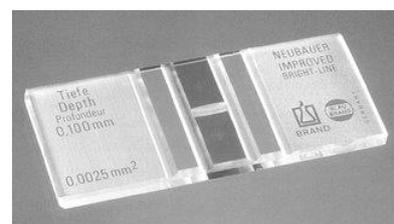
\bar{X} = Promedio de conidias contadas

ID = Inversa de la dilución empleada

Para obtener el número de conidias por gramo del producto, se multiplica el promedio del número de conidias por mililitro obtenido en el recuento, por el volumen empleado en la preparación de la suspensión 10^{-0} y se divide por el peso de la muestra utilizada. Por ejemplo :Si el producto *B.bassiana* tiene una concentración de con/ g \geq de 10^{10} , está apto para ser utilizado en campo.

Cámara de Neubauer

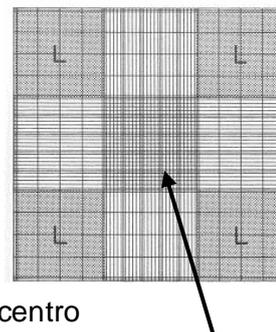
La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula, correspondiente a un cuadrado de 3 x 3



mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm.

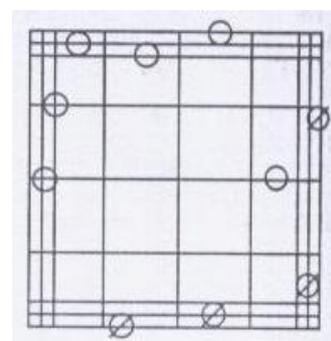
Así el área sombreada marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjeto éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjeto es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro que es igual a 0,0001 cm³

El conteo de conidias se realiza en el cuadrante medio central, contando cinco cuadraditos, los 4 de las esquinas y el centro



Cuadrante central

En cada cuadradito del cuadrante medio central se cuentan todas las conidias que se encuentran dentro y además las conidias que se encuentran en las líneas de borde superior e izquierda del cuadradito, no se cuentan las conidias que se encuentran en las líneas de borde inferior y derecha (Ver figura)



2.2 Porcentaje de germinación o viabilidad

Con esta prueba se determina el porcentaje de conidias típicas del hongo que está en condiciones de germinar en un tiempo determinado, después de ser sembrado en medio de cultivo para hongos. La metodología es la siguiente:

Se toma 0,2 ml de la última dilución y se siembra en placas de Petri conteniendo PDA, incubar durante 18 horas. Luego en la cámara de flujo laminar con la ayuda de un asa, cortar una porción de agar de más o menos 1 cm² y colocarla sobre un portaobjeto, adicionar una gota de azul de lactofenol y cubrir con un cubreobjeto. Sacar de esta manera 5 muestras por placa, llevar al microscopio y realizar el recuento de conidias germinadas y no germinadas, contando como mínimo 200 conidias por cada muestra.

Registrar los datos, sacar el promedio de las 5 lecturas y calcular el porcentaje de conidias germinadas y no germinadas, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{a}{a + b} \cdot 100$$

a = número de conidias germinadas
b = número de conidias sin germinar

Si el resultado es igual o superior al 90 % se considera que la viabilidad del producto es satisfactorio.

2.3 Pureza

Se determina si el producto final es puro o contiene contaminantes indeseables. La metodología es la siguiente:

Se procede a realizar diluciones seriadas hasta 10^{-11} , se siembra 0.2 ml de la última dilución en placas conteniendo medio de cultivo SDA o PDA, sembrar tres placas, incubar durante cinco días a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}$ C. Evaluar y sacar el promedio del número de unidades formadoras de colonias UFC de los contaminantes y el número de UFC del hongo evaluado. Multiplicar por la inversa de la dilución y el volumen empleado. Aplicar los datos obtenidos a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\text{UFC h e}}{\text{UFC t}} \cdot 100$$

UFC he = Unidades Formadoras de Colonias del hongo evaluado

UFC t = Unidades Formadoras de Colonias totales

2.4 Patogenicidad o Virulencia

Es la prueba más importante en el control de calidad de un biopreparado ya que permite determinar si el hongo entomopatógeno controla a la plaga para el cual está recomendado. Sin embargo no asegura que bajo condiciones de campo su eficiencia sea igual a la registrada en el laboratorio.

Para estas pruebas se necesita contar con una población homogénea de insectos susceptibles, en lo posible criada en laboratorio en dieta artificial o natural. No es recomendable utilizar insectos provenientes de campo, porque pueden venir infectados o haber sido expuestos a productos químicos, influyendo en los resultados de la evaluación final.

Los insectos deben tener la misma edad, debiendo ser del mismo estadio.

El número mínimo de insectos por tratamiento es de 50.

La mortalidad del testigo no debe ser superior al 10%

Se utilizan diluciones semejantes a la que se va a utilizar en el campo, junto con un control al que aplica solo agua con solución de Tween, evaluando la mortalidad en los dos ensayos.

El procedimiento es el siguiente:

- Desinfectar los insectos con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 minutos en caso de insectos adultos y 1 minutos en caso de larvas pequeñas o ninfas.
- Lavar con agua destilada estéril por 3 veces.
- Colocar 10 insectos por tratamiento con 4 repeticiones. Se usan placas de Petri, frascos de vidrio, tapers o jaulas según el insecto con el cual se va a trabajar.
- Preparar una dilución a una concentración de 10^8 conidias por gramo, se completa a 100 ml, teniéndose así una concentración de 10^7 .
- Sumergir los insectos, por un minuto o aplicar con un asperjador, tratando de mojar bien los insectos.
- Poner el alimento del insecto y humedad suficiente, tanto a los tratamientos como al control. Evaluar diariamente hasta por 10 días. El tiempo de evaluación varía con cada insecto tratado, dependiendo del ciclo biológico del hongo en el insecto y de la supervivencia del insecto no tratado bajo las condiciones del ensayo.

Con el registro diario, se establece el ciclo de desarrollo del hongo sobre el insecto evaluado, el porcentaje de mortalidad y el promedio del tiempo de mortalidad, que constituyen criterios importantes en la calidad biológica del hongo en estudio.

El porcentaje de mortalidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

En donde:

P_i = Población inicial

P_f = Población final

La mortalidad se corrige utilizando la fórmula de Abbot :

$$\text{Mortalidad Corregida} = \frac{\%MT - \%Mt}{100 - \%Mt} \times 100$$

En donde:

MT = Mortalidad en el Tratamiento

Mt = Mortalidad en el testigo

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

Medios sólidos

1. Agar - Agua (AA)

Agar - 20 g

Agua destilada - 1,000 ml

- Disolver el agar en el agua destilada
- Calentar en baño maría o microonda y distribuir en erlenmeyer de 500 ml a razón de 250 ml.
- Tapar con una torunda de algodón y papel aluminio.
- Esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 20 minutos

Se utiliza para aislamientos monospóricos y para porcentajes de germinación.

2. Papa - Dextrosa - Agar (PDA)

Papa 250 g

Dextrosa o Glucosa 18 g

Agar 20 g

Agua destilada 1000 ml

Preparación:

- Lavar la papa, pelarla, pesarla, picarla en trozos pequeños
- Ponerla a hervir en 1000 ml de agua destilada, por más o menos 35 minutos.
- Filtrar a través de una gasa.

- Completar a un litro y agregar el agar y la dextrosa, mezclar bien.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 250 ml por frasco,.
- Taponar con algodón y papel platina
- Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

3. Papa – Dextrosa - Agar Levadura de Cerveza (PDA-LC)

Puré de papa en hojuela	5 g
Glucosa o Dextrosa	18 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

- Poner a calentar el puré hasta que rompa en hervor y colar con paño suave, mezclar con el resto de ingredientes uniformemente.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 200 ml por frasco,.
- Taponar con algodón y papel platina

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión

4. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

SDA	65 g
Agar	5 g
Agua destilada	1000 ml

- Agregar el SDA y el agar en el agua destilada.
- Calentar la mezcla en baño maría hasta disolver.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 250 ml por frasco.
- Taponar con una torunda de algodón y papel aluminio y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

El SDA es un medio de cultivo que se vende preparado y es utilizado para el aislamiento de diferentes hongos.

5. Papa Zanahoria Agar (PZA)

Zanahoria sin cáscara	20 g
Papa sin cáscara	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

- Lavar en agua corriente la papa y la zanahoria,.
- Rallarlos y hervir en 1000 ml de agua destilada durante 1 hora.
- Colar a través de una malla fina, sin presionar.
- Añadir el agar, calentar en baño maría, hasta que el agar se disuelva y enrazar a 1 L con agua destilada.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml a razón de 250 ml.
- Tapar con una torunda de algodón y papel aluminio.
- Esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 15 minutos

6. Agar Melaza Levadura (AML)

Melaza	15 g
Levadura de cerveza	10 g
Agar	20 g
Papa amarilla	200 g
Agua destilada	1000 ml

- Cortar la papa en cubos de 1 cm y lavar en agua corriente.
- Hervir 800 ml de agua destilada y agregar los cubos de papa, dejando cocinar cuidando de que no se deshagan.
- Vaciar el caldo a un vaso de precipitado y dejar reposar por 5 minutos.
- Extraer el sobrenadante y filtrarlo a través de una gasa o algodón con la ayuda de un embudo.
- Agregar la melaza estéril, la levadura de cerveza y enraizar con agua destilada hasta completar 1 L.
- Ajustar el pH a 5,5 con ácido láctico.
- Agregar el agar y disolver en baño maría.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml a razón de 250 ml, tapar con una torunda de algodón y papel aluminio.
- Esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 15 minutos

La melaza se prepara con anticipación, para lo cual se disuelve en 250 ml de agua destilada y se esteriliza a 121 °C y 15 lbs de presión por 20 minutos

7. Solución antibiótica

- Pesar 0.05 gramos de Cloranfenicol en polvo dentro de un frasco estéril
- Añadir 10 ml de 90 – 95% de alcohol (etanol). No esterilizar esta solución.
- Añadir la solución antibiótica al agar esterilizado en una proporción de 10 ml por medio litro de medio.
- Gentilmente invierta el frasco varias veces para distribuir la solución a través de todo el medio, pero no agite el frasco ya que se puede crear burbujas de aire.
- Autoclavar el medio de nuevo por 10 minutos a 10 lbs y 115°C, para asegurar la esterilidad total.

Usar guantes todo el tiempo cuando manipule antibióticos concentrados. El Cloranfenicol es venenoso

8. Agua destilada estéril (ADE)

Esterilizar agua destilada a 121 °C y 15 lbs de presión por 20 minutos

Medios líquidos

1. Papa Dextrosa (PD) para *B. bassiana*, *I. fumosorosea fumosoroseus* y *L. lecanii*

Papa	250 g
Dextrosa	18 g
Agua destilada	1000 ml

- Cortar la papa en cubos de 1 cm y lavar en agua corriente,.
- Hervir 800 ml de agua destilada y agregar los cubos de papa, dejando cocinar cuidando de que no se deshagan.
- Vaciar el caldo a un vaso de precipitado y dejar reposar por 5 minutos.
- Extraer el sobrenadante y filtrarlo a través de una gasa o algodón con la ayuda de un embudo.
- Enrazar con agua destilada hasta completar 1 L
- Agregar la dextrosa y agitar hasta que se disuelva
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 1000 ml a razón de 650 ml
- Tapar con papel aluminio y esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 20 minutos.
- Dejar enfriar a medio ambiente

2. Papa Dextrosa Levadura de cerveza (PDL) para *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Papa	250 g
Levadura de cerveza	8 g
Dextrosa	18 g
Agua destilada	1000 ml

- Preparar como el medio PD agregando la levadura de cerveza.

3. Hojuelas de Papa – Dextrosa (HPD)

Se usa en vez del tubérculo papa, para *B. bassiana*, *I. fumosorosea fumosoroseus* y *L. lecanii*

Hojuela de papa	5 g
Glucosa o Dextrosa	18 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

- Poner a calentar las hojuelas en 500 ml de agua hasta que rompa en hervor y colar con paño suave, mezclar con el resto de ingredientes uniformemente.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 1000 ml de capacidad a razón de 700 ml por frasco.
- Taponar con algodón y papel platina
- Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

4. Caldo Arroz (CA) : (Para *Pochonia chlamydosporia*)

Arroz	50 g
Glucosa o Dextrosa	18 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

- Hervir el arroz con el agua, luego dejar hervir a fuego lento por 1 hora, colar con un paño fino. Completar hasta 1 litro con más agua y adicionar la glucosa. Distribuir en frascos erlenmeyer de 1000 ml de capacidad a razón de 700 ml por frasco

- Esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

MEDIOS DE MONTAJE

1. Azul de lactofenol

Fenol en cristales :	20 g
Acido láctico :	20 ml
Glicerol :	40 ml
Agua destilada :	20 ml
Azul de algodón :	0,03 g

- Disolver el fenol en agua destilada tibia
- Agregar el ácido láctico y la glicerina, mezclar bien.
- Agregar el azul de algodón.

Solución de Tween al 0,1%

Para el control de calidad de la producción se utiliza una solución conteniendo Tween al 0,1%. Esta solución tiene la propiedad de soltar las conidias, haciendo más fácil su dispersión para todos los procesos del control de calidad y bioensayos.

Se prepara de la siguiente manera :

Tween 20 :	1 ml
Agua destilada :	1000 ml

- Mezclar el agua con el Tween, mover bien hasta homogenizar.
 - Verter en frascos de vidrio (250 ml) resistentes al calor, a razón de 100 ml por frasco. Tapar con papel platina
 - Esterilizar en autoclave a 121° C y 15 libras de presión por 15 minutos.
- Esta solución puede prepararse y guardarse en refrigeración hasta ser utilizada

CONSERVACIÓN DE CEPAS EN SILICA GEL

Esterilización del sílica gel

- Poner 3 g de sílica gel color amarillo en frasquitos de vidrio de 10 ml
- En la boca del frasco colocar un cono hecho de cartulina y taparlo con papel aluminio.
- Esterilizar en el horno durante 1 hora a 180 °C.

Suspensión e inoculación del hongo

- En la placa esporulada del hongo, verter 10 ml de leche estéril al 20%.
- Con la ayuda de una espátula raspar la superficie de la placa y homogenizar.

- Con una pipeta verter la suspensión en una placa de Petri estéril, y con la ayuda de la pinza estéril sumergir pedacitos de papel bond estéril (aproximadamente 1,0 cm²).
- Extraer con la pinza los pedacitos de papel bond humedecidos en la suspensión con el hongo y colocarlos en una placa de Petri estéril para que sequen a temperatura ambiente, durante 24 horas.
- Transcurrido ese tiempo se colocarán aproximadamente 20 pedacitos de papel inoculados con el hongo, en cada uno de los conos de cada frasco, enseguida se reemplazará la tapa de papel aluminio por la tapa de rosca estéril.
- Posteriormente los frascos son colocados a temperatura de 5 °C para su conservación.



Proceso de conservación de cepas en Sílica Gel

TÉCNICAS DE ESTERILIZACION

Metal

Esterilizar estiletes, asas de siembra, etc. calentándolos en la llama del mechero hasta que estén rojos

CALOR SECO U HORNO DE ESTERILIZACIÓN

Se utilizan para esterilizar placas de Petri o tubos de prueba que se utilizaran durante el proceso de producción de hongos. Los materiales de vidrio deben ser envueltos en papel

kraft o papel bond, la placas se envuelven en número de 2 o 3 sin apiñarlos. El tiempo de esterilización es de 1 hora a 180°C

AUTOCLAVE

Se utiliza la autoclave a 15 libras de presión por 15 - 20 minutos para medios de cultivo y por 30 a 45 minutos para sustratos sólidos. El tiempo requerido para la esterilización esta dada en las instrucciones de esterilización de los diferentes medios.

PUNTOS PARA RECORDAR CUANDO SE USA LA AUTOCLAVE

- Use agua destilada o agua blanda en la autoclave
- Asegúrese que los frascos y tubos sean a prueba de calor
- Nunca llene los frascos y tubos hasta el borde, siempre deje en espacio entre el líquido y el borde para permitir que el líquido se expanda al hervir
- Suelte las tapas de los frascos y tubos, antes de ponerlos en la autoclave, esto permite que el vapor entre a los envases y esterilice los contenidos
- Siempre lea las instrucciones del fabricante antes de usar la autoclave.

USO DE LA AUTOCLAVE

1. Ponga suficiente agua destilada o blanda, debe cubrir la resistencia
2. Cargue los artículos a ser esterilizados dentro de la autoclave
3. Cierre herméticamente la tapa
4. Abra la válvula de vapor
5. Prenda la llave de encendido
6. Deje que el vapor salga por los menos cinco (5) minutos antes de cerrar la válvula de vapor. Continúe calentando hasta que la presión alcance 15 lbs
7. Ajuste la presión y gradúe el calor mediante el botón de encendido
8. Deje el tiempo recomendado para la esterilización y luego apague la autoclave
9. Deje que enfríe para reducir la presión a cero
10. Abra la válvula de vapor y libere cualquier remanente de presión
11. Espere cinco (5) minutos antes de abrir la tapa

Recuerde: Nunca abrir la autoclave hasta que la válvula ha sido abierta para liberar la presión

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

**PROHIBIDO FUMAR
PROHIBIDO COMER
PROHIBIDO BEBER**

1. Conservar las mesas de trabajo limpias y ordenadas
2. Conservar los pisos limpios
3. Lavar y almacenar adecuadamente los materiales de vidrio
4. Almacenamiento de los medios de cultivo, insumos y materiales en lugares apropiados (aparadores, almacenes)
5. Mantenimiento de los equipos

VESTIMENTA

Siempre se debe usar el tipo adecuado de ropa de protección como:

- Guardapolvos y / o mandiles de laboratorio
- Máscaras faciales y guantes en los procesos de producción

RIESGOS BIOLÓGICOS

Los hongos entomopatógenos usados para el control de insectos plagas son muy seguros, PERO pueden causar reacciones alérgicas si son inhalados.

Algunos contaminantes comunes como *Aspergillus* spp. son peligrosos.

Los que trabajan en el laboratorio deben aprender a reconocer y disponer de los contaminantes en forma segura.

SIEMPRE conservar las mesas, equipos y ropa de protección limpios.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE MICROORGANISMOS

Ventajas:

- Son efectivos par el control de plagas
- Mayor seguridad en relación a los productos químicos
- No se acumulan en la cadena alimenticia
- No causan resistencia en la plaga, por lo que es una opción de manejo sostenible.
- No dejan residuos tóxicos en los productos, por lo que son de utilidad en la agricultura orgánica.
- Son inocuos al hombre, animales y medio ambiente
- No afectan a los insectos benéficos
- Se aíslan fácilmente y se pueden reproducir en medios artificiales

Desventajas:

- Variabilidad genética del agente
- Experimentación larga: laboratorio, invernadero, campo
- Resultados afectados por; suelo clima, otros micro organismos

RECOMENDACIONES PARA EL EMPLEO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS:

1. Evaluar el nivel de población de la plaga y daño en el cultivo, antes de la aplicación de los hongos entomopatógenos . La programación de aplicación de los hongos entomopatógenos no debe de coincidir con aplicaciones de fungicidas, azufrados, etc.
2. El empleo de los hongos entomopatógenos no debe limitarse exclusivamente a lugares con alta humedad relativa, debido a que el aceite que se emplea en la preparación de la solución, tiene como función encapsular las conidias del hongo, protegiéndolas de la desecación. También se debe considerar que la humedad natural del insecto es apropiada para la eficacia del hongo. .
3. Utilizar agua potable, de río o de pozo (las aguas turbias, de río o de pozo, se deben dejar reposar por lo menos 30 minutos antes de utilizarla).

4. Además de la dureza y pH del agua que no debe ser mayor de 150 ppm y 6,5, se tiene que tener en cuenta el pH del suelo, que debe ser ácido o ligeramente alcalino (7,2) especialmente para aplicaciones al suelo. Las aguas duras y el pH alcalino inhiben el desarrollo de los microorganismos. El empleo de ablandadores de agua disminuyen la dureza, bajando también el pH. Por otro lado si se emplea agua cuya dureza es menor a 150 ppm, usar solo un corrector de acidez si es necesario.
5. La aplicación de los hongos entomopatógenos debe hacerse, preferentemente, por la tarde, cuando la radiación solar no es muy fuerte.
6. El éxito de la aplicación y el control con hongos entomopatógenos depende también de la elección de los equipos de aspersión. Se utilizan equipos (mochilas) convencionales, utilizando boquilla cónica de gotas finas, no debe tener desgaste ni daños en el orificio de la boquilla de tal manera que se obtenga una aplicación uniforme. Los equipos deberán ser nuevos o limpios, libres de residuos químicos, los cuales inhiben la viabilidad de las conidias. Tener especial cuidado en la limpieza del equipo cuando anteriormente se ha utilizado para la aplicación de funguicidas. También es importante tener en cuenta que es mas importante el depósito del depósito que corresponde con la dosis, se debe tener de 80 a 100 gotas / centímetro cuadrado de hoja. Para la aplicación se debe tener en cuenta la velocidad del viento, este seca el producto, se debe aplicar con viento suave o sin ella
7. El efecto residual de los microorganismos entomopatógenos es de una semana. Evitar las pérdidas del producto por deriva, escurrimiento y turbulencia del viento.
8. En frutales, para el control de las moscas blancas que secretan cera o mieles se recomienda lavar a presión a las plantas (con 200 g de jabón pepita por 200 litros de agua), uno o dos días antes a la aplicación de los hongos entomopatógenos, con la finalidad de limpiar la cera, y el cuerpo del insecto quede expuesto .

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN Y USO DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

DOSIS: 2 bolsas de 800 g por 200 litros de agua.

1. Preparar el agua para aplicar el hongo entomopatógeno. Medir la dureza y acidez del agua, si los valores sobrepasan a 150 ppm y pH 7 respectivamente utilizar ablandadores para disminuir la dureza y por consiguiente el pH. Si se emplea agua cuya dureza es menor a 150 ppm, entonces, usar un corrector de acidez.
2. Agregar 100 ml de aceite agrícola en la bolsa de 800 gramos de hongo y mezclar.
3. Agregar a la bolsa 1 litro de agua preparada, y mezclar tratando de soltar las conidias del arroz hasta crear una emulsión.
4. Verter la mezcla en un colador y recoger el contenido en un balde.
5. El arroz que quede en el colador debe ser lavado con agua hasta que quede sin el hongo.

6. Dejar reposar la solución obtenida del filtrado por un tiempo de 6 a 16 horas, tiempo suficiente para que se hidraten las conidias secas del hongo
7. Agitar la mezcla y verterla en el cilindro.
8. Llenar el equipo de aspersión y seguir agitando cada vez que se repita esta acción.
9. Dirigir la aspersión en los lugares donde se encuentran los insectos.

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN y USO DE *P. chlamydosporia*

Aplicación en solución al suelo

DOSIS: 3 - 5 bolsas por 200 litros de agua

El volumen de agua a utilizar es variable dependiendo de la planta a tratar, en árboles perennes utilizar 2 litros de la solución por planta adulta, por drench ó por goteo, o también 30g por planta.

Para ornamentales se recomienda diluir el producto en agua y sumergir las estacas durante 15 minutos antes de sembrar o aplicar el producto en el medio de crecimiento

1. Preparar el agua para aplicar el hongo nematófago. Medir la dureza debe ser > de 150 ppm y acidez del agua, que debe ser de 5.5 - 7, si los valores sobrepasan a 150 ppm y pH 7 respectivamente utilizar ablandadores para disminuir la dureza y por consiguiente el pH.
2. Abrir la bolsa por un costado y agregar de 50 a 100 ml de aceite agrícola vegetal en cada una de las bolsas y agregar aproximadamente un litro del agua preparada. Frotar con la mano para desprender las clamidosporas del arroz.
3. Verter el contenido de la bolsa en un recipiente (balde) con la ayuda de un colador.
4. Nuevamente colocar medio litro de agua en la bolsa y verter.
5. Repetir este proceso hasta separar por completo las esporas y clamidosporas del arroz, para lo cual se utiliza aproximadamente 2.5 litros de agua.
6. Colocar el caldo de entomopatógeno en una botella o balde y dejarlo a temperatura ambiente, en un lugar sombreado por un periodo de 6 horas como mínimo y 16 horas como máximo, tiempo suficiente para hidratar las esporas y clamidosporas secas del hongo.
7. Agitar la mezcla y verterla en el cilindro.
8. Llenar el equipo y seguir agitando cada vez que se repita esta acción.
9. Dirigir la aplicación a nivel de la raíz del cultivo, lugar donde se encuentran los nematodos.
10. El arroz que queda después del lavado, echarlo en el surco, debido a que aún conservan esporas y clamidosporas adheridas, que servirán para repoblar la materia orgánica presente en el cultivo.

Aplicaciones al suelo

DOSIS: 10 a 20 bolsas por hectárea / campaña, en una sola aplicación o fraccionado

Incorporar a la preparación del terreno mezclado con materia orgánica totalmente descompuesta. Siguiendo aplicaciones vía sistema de riego después del trasplante

Aplicaciones en materia orgánica (estiércol vacuno, composta, humus de lombriz etc.

DOSIS. 1 bolsa x 20 kilogramos de materia orgánica

Mezclar el contenido de la bolsa con la materia orgánica a utilizar, mezclando bien hasta obtener un producto homogéneo. Con esta operación, se le crean mejores condiciones al hongo para su posterior colonización de la rizosfera de las plantas, contribuyendo además en la retención de las partículas de agua mejorando la fertilidad y estructura del suelo.

EVALUACIÓN.

Hacer una evaluación previa para determinar el número de nematodos presentes en el campo. Se debe realizar aplicaciones con bajos niveles de J2 en el suelo (grado de agallamiento 1 y 2). Contar N° de juveniles J2 / 100 g de suelo para árboles frutales, o 2 a 4 juveniles / 100 g de suelo para paprika

Hacer una evaluación y tomar muestra de suelo a los 45 días de la primera aplicación, tiempo mínimo de evaluación considerando el ciclo del nematodo *M. incognita*, los juveniles de la primera generación pueden ingresar a las raíces y no dar datos exactos de control.

PRECAUCIONES QUE SE DEBEN TENER EN CUENTA AL APLICAR HONGOS ENTOMOPATOGENOS

Aunque los hongos entomopatógenos son inoocuos a los hombres, animales y plantas, para su preparación y aplicación se deben tener ciertas precauciones como:

- Preparar la solución bajo sombra, nunca a pleno sol.
- Usar guantes para realizar el lavado del arroz.
- Usar mascarilla para las aplicaciones
- Evitar todo contacto innecesario con el producto, no ingerirlo ni inhalarlo.
- No fumar o comer durante su manipuleo. Lavarse y cambiar de ropa después del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Alves, S. 1998. Controle microbiano de insetos. 2ª Ed. Brasil

Alves, S. 1999. Relatorio sobre la consulta para la construcción de un laboratorio de producción de entomopatógenos y formación de personal. SENASA/BID.

Antia, O. P.; F. J. Posada; A. E. Bustillo; M. T. González. 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Avances Técnicos Cenicafé N° 182. Colombia. p: 1 - 12

Gómez, H. 1991. *Verticillium lecanii* (Hyphomycetes : Moniliales) hongo entomopatógeno de *Ceroplastes floridensis* (Homoptera : Coccidae) Rev. Per. Ent.

Gómez, H. 1999. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de la “mosca blanca” *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae) en Lima. Rev. Per. Ent.

Gómez, R. 1999. Experiencias en la utilización del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin en el control de plagas agrícolas en el Perú. Rev. Per. Ent.

Humber, R. Key to genera of fungal pathogens an associated of insects, spiders and mites. USDA – ARS Plant protection research Unit US Plant, Soil and Nutrition Laboratory. Tower Road Ithaca, New York.

LAVERLAM S. A. Manual de control biológico de productos agrícolas

Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. CATIE

Soberanis, W.; A. Zapata; E. Torres; W. Montes; H. Gómez. 2006. Nueva tecnología de producción de hongos benéficos. Resumen XIX congreso Peruano de Fitopatología. Cajamarca, Perú.

Vélez, P. A.; F. J. Posada; P. Marín; M. T. González; E. Osorio; A. E. Bustillo. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico N° 17. Cenicafé, Colombia. p: 1 – 37.

DEDICATORIA

A la memoria de la Mblg. Anny Mercedes Zapata Granja, quien laboró en el Laboratorio de Entomopatógenos la SCB, desde 1997 al 2014, dedicándose al control microbiológico de plagas, aislando, conservando y desarrollando métodos de conservación de hongos y bacterias entomopatógenas, así como el desarrollo de metodologías y bioensayos para su producción y uso en campo. Anny fue una persona muy dedicada y comprometida con el medio ambiente, poniendo todo su empeño en obtener alimentos sanos y un mundo mejor para vivir.