



Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria  
Tembiporupyahu Kokue Paraguái Pegua



**Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria**

**Capitán Miranda**

**Manual de protocolos de Aislamiento, Purificación, Conservación y Multiplicación  
de Hongos Entomopatógenos**

**Patricia Rodríguez Ríos**

**2019**

## INDICE

<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>Generalidades</b>	<b>4</b>
<b>Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos</b>	<b>5</b>
<b>Condiciones de bioseguridad</b>	<b>6</b>
<b>Medios de cultivo</b>	<b>7</b>
<b>Siembra</b>	<b>8</b>
<b>Caracterización morfológica</b>	<b>11</b>
<b>Características Morfológicas de</b>	<b>12</b>
<b>Producción masiva</b>	<b>13</b>
<b>Evaluación de los aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> sobre obreras de <i>atta</i>.</b>	<b>14</b>
<b>Concentración letal media (CL50) de los mejores aislamientos.</b>	<b>14</b>
<b>Bibliografía consultada</b>	<b>15</b>

## **Manual de protocolos de Aislamiento, Purificación, Conservación y Multiplicación de Hongos Entomopatógenos.**

### **PROYECTO 14-INV-118**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

El control biológico es una herramienta muy importante dentro del Manejo Integrado de Plagas, que se utiliza para controlar poblaciones de organismos que promueven pérdidas en el sector agrícola y forestal. El Manejo Integrado de plagas consiste en la adopción e implementación de experiencias científicas utilizadas en el control de plagas teniendo en cuenta los factores de mortandad a través del uso integrado de los métodos de control seleccionados en base a los parámetros económicos, ecológicos y ambientales. Estos parámetros son importantes para ampliar y mejorar la calidad y efectividad de los métodos de control, minimizando los problemas que generan el uso excesivo de control químico. (Martins –Pires, 216)

La implementación del Control biológico para el manejo de plagas en cultivos agrícolas y forestales, es un tanto tímida en nuestro país, tal vez sea debido a que comparado con un control químico que es de acción más drástica e inmediata en el control de plagas, el control biológico es más discreto y en la mayoría de las veces no se ve, o sea el productor no ve la plaga muerta en el suelo.

Con el interés de implementar el uso de agentes de control biológico se ha estudiado a la *Beuveria bassiana*, que es un hongo entomopatógeno para el control de hormigas cortadoras dentro del Proyecto 14- INV- 118, que es un proyecto en cooperación del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria y Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Dentro de este Manual se resumen Protocolos de Aislamiento, Producción y Masificación de Hongos Entomopatógenos.

#### **II. GENERALIDADES DE LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS**

Los hongos entomopatógenos, son hongos que pertenecen a una gran variedad de especies y a un sin número de hospedantes que se caracterizan por el crecimiento de micelios sobre el huésped.

Todos los insectos son susceptibles a ser afectados por algún hongo. Ciertos hongos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasita sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición.

El crecimiento saprofítico puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidios 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, se pueden citar algunos que son usados frecuentemente para este fin a la *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*.

### III. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

La enfermedad producida por hongos se llama micosis. Tanada y Kaya (1993), que pueden ser divididas en tres etapas.

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 da origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. 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 sustancias nutricionales y antifúngicas y estado de desarrollo del insecto. La digestión del integumento se produce mediante las enzimas (proteasas, amino peptidasas, lipasas, esterases 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 ameboideos, 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 saprofitica: 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%.

#### IV. CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD

##### Higiene

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.

Mantener el mayor cuidado en la limpieza del material y del laboratorio es fundamental para realizar trabajos confiables.

### **Lavado y esterilización**

Para mantener los cultivos puros libre de contaminantes que generalmente se encuentran en el ambiente, es necesario el lavado de todos los materiales a ser utilizados en el laboratorio, con desinfectantes y enjuagues con agua destilada, y luego deben ser esterilizados. 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. La esterilización se puede realizar de dos formas, por calor húmedo o a presión de vapor de agua se consigue con el uso de una autoclave a una temperatura llega a 121 °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.

El uso de los rayos de luz ultravioleta (U.V.) también es eficaz para eliminar organismos que se encuentran sobre superficies, ya que este tipo de luz tiene poca penetración, esto se puede hacer a través de la cámara de flujo laminar.

### **Desinfección del Laboratorio y lugares de almacenamiento**

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 desnaturando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agentes deshidratantes. Usar alcohol para limpiar todas las superficies y lugares de almacenamiento del laboratorio.

## **V. MEDIO DE CULTIVO**

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 deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos 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 de cultivo se disponen en placas Petri o en tubos inclinados. Las placas de Petri 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.

Existen diferentes tipos de medios de cultivo, esto depende del objetivo del cultivo:

#### Agar Agua

Es un medio pobre en el cual el micelio crece en forma muy dispersa. 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.

#### Papa Dextrosa Agar (PDA)

Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos, y es el más utilizado durante los experimentos de la investigación. Al aislar 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. Se prepara con 200 g de papa, 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.

## VI. 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 esté esporulando.

### **Colecta de hongos entomopatógenos**

Colectar consiste en recoger insectos vivos o muertos, en el follaje, tallos, corteza de los árboles, sobre la superficie o en el interior de éstos, en el suelo, inclusive en crías 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 coleccionar insectos en diferentes estados de desarrollo que presenten signos iniciales o avanzados de estar parasitados.

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. Fecha.
6. Observaciones adicionales (estado del insecto, signo, síntomas, condiciones climáticas, etc.).

Una vez en el laboratorio, las muestras son procesadas como sigue:

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. 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.



### **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.

El procedimiento consiste en:

1. Sembrar el hongo que se ha aislado directamente del insecto, en un tubo inclinado con medio de cultivo e incubarlo a 20 o 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 (10o 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 durante 20 minutos.
3. Preparar una suspensión de esporas, a partir del tubo con el hongo en desarrollo.
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 baño maría 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 o 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 un solo conidio.

### **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 conidios de 2500/ml con Tween 80 al 1% estéril. Poner en un vaso de precipitación una cantidad conveniente de agar agua caliente (40°C). Poner en un vaso de precipitados una cantidad conveniente de agar agua caliente (40°C).
2. Sumergir el extremo de una lámina portaobjetos en el vaso y sacarlo.
3. 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.
4. Sembrar el hongo con una ansa en la porción de la lámina que tiene la película del medio y estirla cuidadosamente.
5. Incubar por dos - tres días.
6. Observar en cámara de flujo laminar al microscopio las colonias que se han formado.
7. Escoger la colonia que esté más aislada
8. Buscar al microscopio la punta de una hifa solitaria y cortarla.
9. Poner la punta cortada en placa Petri conteniendo PDA.

## VII. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

El primer paso en el estudio de los hongos entomopatógenos es realizar una correcta identificación de la especie. 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 20o 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

### 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 metileno u otra solución.
4. Con una aguja, tomar una pequeña muestra del tejido hifal y dispersarla en un portaobjetos sobre una gota del colorante y colocarle un cubre objeto.

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.

#### **Características Morfológicas de *Beauveria bassiana***

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

**Conidióforos:** de 1-2 $\mu$  de diámetro donde nacen células conidiógenas en grupos grandes. Células conidiógenas (c.cs.): están agrupadas formando grupos compactos grandes y a veces solitarios, en forma de botellitas de 3 a 6 x 3 a 5 $\mu$ . 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.

#### **Conteo de conidios en la cámara de Neubauer (hemacitometro)**

Para determinar el número de conidios por volumen contenidos 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 mm<sup>2</sup>. La superficie cubre un área total de 9 mm<sup>2</sup>. Adicionalmente, el cuadrado del centro está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados de 0.2 mm<sup>2</sup> de lado y una superficie de 0.04 mm<sup>2</sup> cada uno. Los cuadrados del centro a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños de 0.0025 mm<sup>2</sup> cada uno. Cinco de estos cuadrados se utilizan para el conteo de los conidios. Se cuentan los conidios que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así los conidios que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda.

#### **Procedimiento**

1. Preparar una suspensión de conidios en agua destilada con Tween 80 al 0.1%.
2. Con una pipeta Pasteur llenar la cámara con la suspensión de conidios y cubrirla con el cubre objeto.
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 conidios 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 conidios que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran

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

5. Determinar el número de conidios por ml y el número total de conidios utilizando la siguiente fórmula: Conidios / ml = # de conidios contadas x 25,000 x factor de dilución  
Conidios total = conidios / ml x Vol. de la suspensión original de conidios.

## **IIX. PRODUCCIÓN MASIVA**

### **Preparación del inóculo**

Para la preparación del inóculo de *Beauveria bassiana*; semillas de arroz blanco será depositado en un beaker de 500 ml. Al cual se le agregara agua destilada estéril hasta cubrir completamente el arroz dejando en reposo por 1 hora. Posteriormente se eliminará todo el agua mediante un tamiz y el arroz humedecido se colocara en bolsas de polietileno antes de autoclavar a una temperatura de 121 °C por 15 minutos. Se dejara enfriar, las bolsas serán inoculadas con discos de 2 cm de micelio de 7 días de un cultivo de *Beauveria bassiana* y se incubaron a 25 ±1°C y HR 60% durante 10 días momento en el cual las semillas de arroz fueron colonizados completamente por el hongo.

### **Preparación de la solución de esporas.**

Una vez finalizó el período de esporulación de los aislados de *Beauveria* sobre arroz, se tomara un beaker de 250 ml, con un volumen de agua destilada estéril de 50 ml; para facilitar la remoción del inóculo y la obtención de una solución homogénea, se agregara 0.05% de solución Tween al 80%. Luego, con una cámara de Neubauer y con un microlitro de la solución madre, se determinara la concentración ( $1 \times 10^8$  conidios/ml) con la fórmula de Goettel e Inglis (1997).

$$NC = (SC / 5) * 50000$$

### **Donde:**

NC= Número de conidias/ml de suspensión

SC= Sumatoria de las conidias contenidas en los cinco cuadros de lado de la cámara de Neubauer

### **Captura de hormigas obreras del genero *Atta***

Se realizaran exploraciones en campo en zonas aledañas a áreas cultivadas. Allí se seleccionaran hormigueros jóvenes (con uno o dos orificios o bocas de entrada) y una

vez localizados se excavarán y extraerán del hormiguero (utilizando una pala y guantes quirúrgicos al momento de la captura) la mayor cantidad de individuos. Posteriormente los individuos serán depositados en recipientes plásticos de cierre hermético para su traslado al Laboratorio.

### **IX. Evaluación de los aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre obreras de *atta*.**

Por cada aislamiento de hongo obtenido se emplearán 10 individuos por cuatro repeticiones para un total de 40 individuos por tratamiento. Se agregará en una caja de Petri ocho mililitros de la suspensión de esporas a  $1 \times 10^8$  conidias/ml. Luego serán dispuestas 10 hormigas por cada caja de Petri durante un minuto con el objeto de favorecer el contacto tarsal de las hormigas con la suspensión conidial; después de este tiempo se depositarán las hormigas en un embudo con rejilla donde serán colocadas las hormigas a las cajas de Petri definitivas las cuales estarán preparadas con papel filtro previamente humedecido con 1 ml de agua destilada estéril. Por último, se expondrán las hormigas a 12 horas luz/12 horas oscuridad y una temperatura entre 24°C y 26°C. En el caso de las hormigas control se aplicará únicamente agua destilada estéril al papel filtro utilizado. Éstas serán provistas de agua y hojas frescas de mandioca como alimento durante el transcurso del experimento previa desinfección con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % y agua destilada estéril, como estrategia para evitar el transporte de agentes extraños.

Durante la evaluación del bioensayo, se observará la supervivencia durante diez días y se registrará el número de individuos muertos por día; con esta información se calculará el porcentaje de mortalidad diaria y acumulada, además del tiempo letal 50 (TL50) que indica el tiempo en que muere el 50% de la población. Los individuos muertos se extraerán todos los días y se ubicarán en cámara húmeda a una temperatura de 25°C durante ocho días, para favorecer la esporulación del hongo (micosis), con la que se verificará la muerte por el mismo (mortalidad intrínseca).

#### **Concentración letal media (CL50) de los mejores aislamientos.**

Para realizar las pruebas de CL50 se tendrán en cuenta los dos aislamientos de *Beauveria bassiana* que presentaran los mejores valores de patogenicidad en términos de TL50 y micosis. Para ello se utilizarán cinco concentraciones  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidias/ml y el testigo absoluto. El procedimiento de bioensayo se llevará a cabo siguiendo los lineamientos descritos arriba para la determinación de la capacidad letal de los aislamientos. Se medirá la mortalidad diaria y acumulada de las hormigas cortadoras de *Atta* spp. y la verificación de muerte por micosis.

## **Análisis de datos**

Los resultados de mortalidad a los 10 días, se analizaron por medio de un ANOVA de una vía y una comparación de medias con la prueba de Tukey, previa transformación arcoseno de los datos. El tiempo letal medio (TL50) y la concentración letal media (CL50) por medio de un análisis Probit.

## **X. Bibliografía consultada**

Evaldo Martins pires. 2016. Control Biológico, Universidad Federal de Vicosa. Brasil.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of entomology.

Pérez, C.N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural – CEDAR.

Tanada, Y. And H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic Press, San Diego, California, USA:

Samson, R.A., H.C. Evans and J.P. Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Verlag, Berlin