

Libros de **Cátedra**

Patología de insectos

Metodologías y técnicas de laboratorio.
Un aporte al trabajo experimental

Claudia C. López Lastra y Juan José García
(coordinadores)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS NATURALES Y MUSEO


Eduulp
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

PATOLOGÍA DE INSECTOS
METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO.
UN APORTE AL TRABAJO EXPERIMENTAL

Claudia C. López Lastra
Juan José García
(coordinadores)

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

edulp
EDITORIAL DE LA UNLP

A nuestros hijos. *In Memoriam* a nuestros padres

A los grandes maestros de la Patología de Insectos Profesores: Tanada, Kaya, Weiser, Lacey, Boucias, Hajek, Humber, Alves ... y a tantos otros que sería difícil de enumerar aquí.

Agradecimientos

A nuestros directores de tesis. A todos los alumnos que han cursado esta asignatura creada en 2001 mediante un proyecto de “devolver” y “agradecer” por todo lo aprendido. A la Facultad de Ciencias Naturales y a la Universidad Nacional de La Plata, a todos los colaboradores con la asignatura, tanto a los que han colaborado como *Ad honorem* así como a los como profesores invitados. Al CONICET por brindarnos la oportunidad de poder obtener becas externas pos doctorales que ampliaron las perspectivas de formación en el tema así como poder conocer e interactuar con muchos de los más importantes referentes de la Patología de Insectos a nivel mundial. A las fuentes de financiamiento externos e internos que hicieron posible poder afrontar la compra de insumos costosos que se usan en esta asignatura, y al CEPAVE que como dependencia de la FCNyM (UNLP) nos ha brindado la posibilidad durante todos estos años de utilizar los laboratorios de investigación en los que nuestro grupo desarrolla la tarea diaria, debido a la necesidad imperiosa de utilizar equipamientos especiales para poder dictar adecuadamente esta materia. A la editorial EDULP que ha aceptado editar este libro mediante la convocatoria anual y permite dar a conocer los trabajos docentes de la UNLP. A todos los autores que participaron en este libro, al Dr. Sosa Gómez, colega y especialista internacional por su aporte en el prefacio. Nuestro especial agradecimiento a la Sra. Marcela Hipperdinger que ha colaborado con gran esmero en la tarea editorial, y al Sr. Darío Gabriel Fontela, CPA de CONICET en el INIFTA, quien ha colaborado con varias ilustraciones para los capítulos del libro.

“La naturaleza gusta de ocultarse...”

HERÁCLITO

Índice

Prefacio de los autores	9
Prefacio invitado Dr. Daniel R. Sosa Gómez	10

Capítulo 1

Historia y alcances de la Patología de Insectos.....	12
<i>Claudia C. López Lastra y Juan José García</i>	

Origen de los estudios en la temática y antecedentes en la historia de esta disciplina, así como los trabajos de los investigadores referentes y pioneros en los distintos grupos de microorganismos patógenos.

Capítulo 2

Patógenos de insectos	17
<i>Claudia C. López Lastra y Juan José García</i>	

Grupos de patógenos, signos y síntomas, definiciones de enfermedad, tipos de diagnosis, vías de entrada al hospedador y transmisiones a otros insectos sanos.

Capítulo 3

Virus Entomopatógenos	23
<i>Evangelina Muttis y María Victoria Micieli</i>	

Modos de transmisión y bioensayos. Métodos de infección de insectos sanos con virus a través de bioensayos experimentales. Identificación y de preservación del material.

Capítulo 4

Bacterias entomopatógenas..... 33

Claudia C. López Lastra, Alejandra C. Gutierrez y Juan José García

Principales grupos de bacterias asociadas a insectos, tanto simbiotes como patógenas. Diversidad de hábitats, rango hospedador, métodos de prospección y de aislamiento. ID morfológica y fisiológica. Métodos de preservación utilizados.

Capítulo 5

Protozoos entomófilos..... 42

Juan José García

Identificación de los grupos taxonómicos, ciclos de vida y métodos de prospección, identificación y preservación del material.

Capítulo 6

Hongos patógenos de insectos 54

Claudia C. López Lastra, Alejandra C. Gutierrez, Andrea V. Toledo y Romina G. Manfrino,

Identificación de hongos entomopatógenos, metodologías de transmisión, ciclos de vida y vías de infección. Se describen en detalle los métodos de prospección, aislamiento, identificación y preservación.

Capítulo 7

Preservación de entomopatógenos y normativas y funciones de las colecciones de cultivos microbianos 62

Alejandra C. Gutierrez, Marcela L. Hipperdinger y Claudia C. López Lastra

Métodos de preservación para los distintos grupos de patógenos tratados en el libro. Protocolos específicos para fijación y tinciones.

Capítulo 8

Bioensayos con entomopatógenos y uso de protocolos..... 71

Andrea V. Toledo, Claudia C. López Lastra, Alejandra C. Gutierrez, Evangelina Muttis y Juan José García

Protocolos y metodologías utilizadas para infectar insectos sanos con los patógenos. Realización de bioensayos y para que se utilizan. Métodos y programas a usar para obtener la dosis letal 50 y 90, y el tiempo letal 50 y 90, así como el tiempo medio de

supervivencia Cuales son los factores que influyen y que hay que tener en cuenta al realizar un bioensayo.

Capítulo 9

Métodos de biología molecular utilizados para la identificación y caracterización de patógenos de insectos 84

Alejandra C. Gutierrez, Romina G. Manfrin y Celeste P. D'Alessandro

Metodologías básicas de ID mediante técnicas de biología molecular para hongos, bacterias y virus patógenos de insectos. Protocolos.

Anexos..... 96

Glosario 108

Los autores 112

CAPÍTULO 8

Bioensayos con entomopatógenos y uso de protocolos

Andrea V. Toledo, Claudia C. López Lastra, Alejandra C. Gutierrez, Evangelina Muttis y Juan José García

Bioensayos: Definición; Objetivo; Utilidad. Bioensayos con hongos entomopatógenos: Preparación de inóculos; Métodos de inoculación; Protocolos estandarizados. Bioensayos con bacterias entomopatógenas: Determinación de la concentración letal media (CL50) y la potencia de formulados de *Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti) y de *Bacillus sphaericus*. Bioensayos con virus entomopatógenos.

Bioensayos

Definición

Cualquier experimento en el que se usan seres vivos como objeto de estudio para medir la potencia de un estímulo.

Objetivo

El objetivo principal de un bioensayo es reflejar la realidad de como afectaría el estímulo a los organismos vivos en su medio natural.

Utilidad

Los bioensayos pueden ser usados para:

- Determinación de la virulencia
- Comparación de la virulencia entre aislamientos
- Determinación de dosis-respuesta

- Determinación del rango hospedador
- Determinación del potencial epizootico
- Determinación de los efectos sobre factores abióticos y bióticos: edad del hospedador, planta hospedera, humedad, temperatura y formulación

Los bioensayos pueden proporcionar información valiosa sobre la interacción entre el patógeno, el insecto y el medio ambiente, pero el valor de los resultados depende del diseño, la ejecución, el análisis y la interpretación de los resultados. Asimismo, el objetivo y las hipótesis deben ser definidos antes de realizar el diseño experimental, el cual deberá tener en cuenta las siguientes consideraciones:

En cuanto a aspectos biológicos:

- El patógeno no debe perder virulencia en cultivo.
- El inóculo debe ser viable. En el caso de los hongos entomopatógenos se utiliza como parámetro la viabilidad o porcentaje de germinación.
- El método de aplicación debe ser el adecuado, para lo cual previamente se deben probar diferentes metodologías de aplicación hasta encontrar la más precisa y efectiva para cada modelo hospedador-patógeno seleccionado.
- El insecto que se utilice debe estar sano y no debe haber estado sometido a estrés y/o a condiciones de hacinamiento.
- Se deben utilizar insectos no tratados como control para evaluar la supervivencia de los insectos sin la aplicación del patógeno. Los controles pueden ser positivos (usando por ejemplo solo el diluyente en el que se suspenden las esporas) y también negativos (sin ningún agregado).
- Es fundamental conocer el ciclo de vida del insecto problema y sus condiciones de cría artificial, por ejemplo tipo de dieta, temperatura y humedad de desarrollo.
- Se debe estimar la temperatura y la humedad relativa a lo largo del ensayo.

En cuanto a los aspectos estadísticos:

- Se deben definir tanto el tamaño de la muestra como la cantidad de réplicas por tratamiento.
- Se debe desarrollar un procedimiento de muestreo que refleje el estado de salud del patógeno en el campo.
- Se deben seleccionar adecuadamente los test estadísticos que consideremos correctos para probar las hipótesis planteadas.

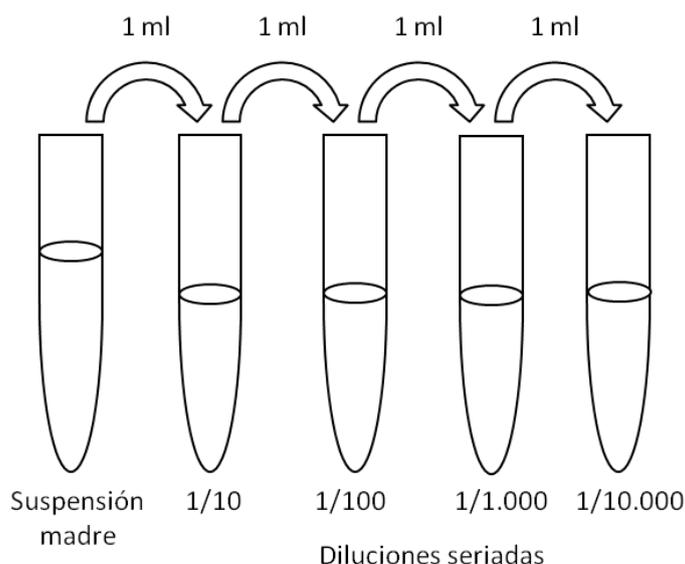
Bioensayos con hongos entomopatógenos

Preparación del inóculo a partir de cultivos en estado sólido

Para preparar el inóculo lo primero que se debe tener en cuenta es si los conidios a utilizar son o no hidrofóbicos. En el primer caso se recomienda realizar la suspensión de los mismos en agua destilada estéril con el agregado de un tensioactivo que evite la agregación de los conidios en cúmulos, lo cual impide una dispersión homogénea. Los tensioactivos mayormente utilizados en los bioensayos con hongos entomopatógenos son Tween 20 y Tween 80 (polisorbato de sodio), en una concentración de 0,01% v/v.

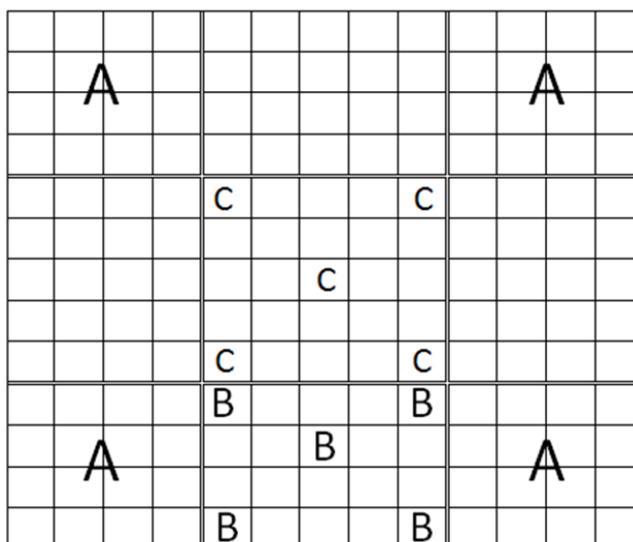
Una vez seleccionado el vehiculizante adecuado, se debe proceder a extraer o cosechar los conidios a partir del cultivo fúngico. Si el cultivo se encuentra crecido en medios de cultivo artificiales en placas de Petri, los conidios podrán cosecharse raspando con una espátula toda la superficie de la colonia y depositándolos directamente dentro de tubos de ensayo conteniendo el vehiculizante. Si los conidios fueron crecidos sobre un sustrato natural, como por ejemplo granos de arroz, una de las formas de extraerlos es colocando una cantidad adecuada de granos dentro de los tubos y agitándolos vigorosamente a fin de provocar su desprendimiento. De esta manera obtendremos una **suspensión madre**.

Antes de realizar la cuantificación, la suspensión madre deberá ser filtrada a través de una malla de nylon a fin de eliminar los restos de micelio. A partir de esta suspensión deberemos realizar diluciones seriadas con el objetivo de efectuar el recuento en una de las diluciones menos concentradas. Generalmente se realizan diluciones seriadas 1/10, lo que significa que iremos transfiriendo 1 ml de la suspensión precedente a 9 ml de la siguiente. De este modo los tubos deberán rotularse como se indica a continuación:



Por lo general el recuento se efectúa perfectamente a partir de la tercera o cuarta dilución. Para esto se toma una alícuota mediante una micropipeta y se deposita en un hemocitómetro (en este caso usamos la cámara de Neubauer). Previo a la toma de la alícuota es conveniente agitar en vórtex la suspensión para lograr que los conidios se distribuyan en forma homogénea en la cuadrícula.

Debido al tamaño de los conidios fúngicos el recuento puede efectuarse contemplando las cinco celdas que se indican en la figura con la letra C o las cuatro designadas con letra A. En el esquema se observa solo uno de los cuadrantes, pero todas las cámaras poseen uno superior y uno inferior de iguales características.



El recuento de los conidios se realiza en las celdas del cuadrante superior y en las del cuadrante inferior. La suma obtenida en ambos cuadrantes se promedia, y el resultado obtenido (X) se multiplica por el factor de dilución (por ejemplo, si contamos a partir de la tercera dilución seriada este será 1.000), y por el número que contempla el volumen total de las celdas cuantificadas de ambos cuadrantes, y que nos permite obtener la cantidad de conidios por mililitro (si el recuento se efectúa en las celdas C este número será 50.000, mientras que si se hace en las celdas A el mismo será 2.500).

$$\text{Cantidad de conidios/ml} = X \times 1.000 \times 50.000$$

Por último se deberá ajustar la concentración del inóculo a la deseada, utilizando la siguiente fórmula:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

C1 es la concentración de la suspensión madre, V1 es el volumen que se debe tomar de la suspensión madre para obtener la deseada, C2 es la concentración deseada y V2 el volumen

de inóculo que queremos preparar. Por consiguiente, lo que se debe hacer es despejar la fórmula para averiguar V1. Por ejemplo, si queremos preparar 5 ml de una suspensión con una concentración de 1×10^8 conidios/ml y obtuvimos que la suspensión madre tiene una concentración de $2,5 \times 10^9$ conidios/ml, los cálculos serían los siguientes:

$$V1 = \frac{1 \times 10^8 \text{ con/ml} \times 5 \text{ ml}}{2,5 \times 10^9 \text{ con/ml}} = 2 \text{ ml}$$

De manera que deberemos extraer 2 ml de la suspensión madre y colocarlos en 3 ml de Tween para obtener 5 ml de una suspensión con una concentración de 1×10^8 con/ml. Así se concluye con la preparación del inóculo, que luego podrá ser aplicado sobre los insectos blanco utilizando las distintas técnicas mencionadas a continuación.

Nota. Es importante destacar que el hemocitómetro que usamos en este caso, Cámara de Neubauer, se utiliza también para cuantificar bacterias y virus.

Métodos de inoculación

- **Tópica:** El inóculo se aplica sobre el tegumento del insecto.
 1. *Aplicación directa:* el inóculo se aplica directamente sobre el insecto
 - a. Inmersión
 - b. Pulverización
 2. *Aplicación indirecta:* el inóculo se presenta a través de un sustrato secundario.
- **Intrahemocélica:** El inóculo es inyectado en la hemolinfa de los insectos. Se utiliza principalmente cuando se realizan estudios inmunológicos.
- **Per os:** El inóculo es aplicado sobre el alimento que será ingerido por el hospedador.

Parámetros a considerar

- Concentración letal 50 (CL₅₀)
- Concentración letal 90 (CL₉₀)
- Dosis letal 50 (DL₅₀)
- Dosis letal 90 (DL₉₀)
- Tiempo letal 50 (TL₅₀)
- Tiempo letal 90 (TL₉₀)
- Supervivencia
- Mortalidad acumulada / corregida por la fórmula de Abbott

Si alguno de los controles murió, se deberá ajustar la mortalidad corrigiéndola con la fórmula de Abbott:

$$\% \text{ de mortalidad corregida} = \frac{(\% \text{ mortalidad tratados} - \% \text{ mortalidad control}) \times 100}{100 - \% \text{ mortalidad control}}$$

Si el porcentaje de mortalidad en el control fuera igual o superior al 20%, el tratamiento deberá ser descartado y tendrá que ser repetido ya que no tiene validez para los análisis estadísticos posteriores.

Protocolos (Modificados de Landa *et al.*, 1994)

Aplicación por inmersión

- Preparar una suspensión de conidios de por ejemplo *Metarhizium anisopliae* en Tween 80, 0.01% (v/v), a partir de cultivo en arroz: Agregar Tween al cultivo en arroz y filtrar para obtener la suspensión madre, centrifugar 10 minutos en centrífuga de mesa a 500 G y volver a suspender el pellet en 10 ml de Tween, luego colocar en un vórtex durante 2 minutos y hacer 3 diluciones seriadas.
- Cuantificar el número de conidios/ml mediante el uso de un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) y diluir hasta obtener 1×10^7 conidios/ml.
- Esta suspensión será inoculada mediante la técnica de inmersión: Diez larvas de III estadio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) serán sumergidas en la suspensión de conidios, la cual se colocará en un recipiente de capacidad conocida, y otras diez serán sumergidas en Tween 80 0.01% y usadas como controles.
- Una vez secadas al aire en cápsulas con papel de filtro, las larvas se colocarán en dieta artificial (sin inhibidores) por 24 horas y luego se pasarán a recipientes con dieta artificial completa, con inhibidores (que pueden ser antibióticos).
- Utilizar para cada tipo de aplicación 10 larvas (3 repeticiones) y 10 larvas como control. Este es el número mínimo recomendado, en general lo ideal es utilizar el máximo número de individuos disponible para cada repetición.
- Registrar la mortalidad cada 24 horas hasta los 5 días después de realizado el ensayo.
- Explicar los resultados obtenidos de los ensayos realizados en el siguiente TP.
- Explicar que relación tienen los resultados logrados con los postulados de Koch.

NOTA: El Tween utilizado como tensioactivo debe ser esterilizado previamente en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Aplicación por pulverización. Conidios secos

- A partir de un cultivo esporulado del hongo entomopatógeno seleccionado (por ejemplo *Beauveria bassiana*) se realizará un barrido o raspado superficial de los conidios con ansa de Drigalsky, en condiciones estériles (bajo cámara de flujo laminar). Con un pincel de pelo de marta esterilizado previamente se espolvorean esos conidios sobre los insectos “blanco” seleccionados. El primer día permanecerán sin alimento o bien con alimento sin inhibidores (antibióticos u otros) y a partir de las 48 horas se pueden alimentar con dieta artificial con inhibidores de bacterias u otros hongos, o bien con alimento natural (hojas / plántulas del cultivo del cual se alimenta ese insecto) de acuerdo al insecto seleccionado para el ensayo.
- Los insectos se acondicionarán en recipientes adecuados (limpios y con ventilación apropiada) de acuerdo a la especie de insecto blanco seleccionado, y se mantendrán en cámaras incubadoras bajo condiciones controladas de temperatura, por lo general de 25 °C, fotoperíodo a designar (por lo general 12 hs luz y 12 hs oscuridad) y humedad relativa en general entre 70% - 80%, aunque puede variar de acuerdo a la especie fúngica y a la especie de insecto hospedador. En el caso de los hongos Entomophthorales la temperatura máxima recomendada es de 20 °C. Siempre se deben utilizar igual cantidad de insectos como control. En este caso el control positivo sería espolvoreado con conidios previamente esterilizados y el negativo sin ningún agregado de conidios. El ensayo deberá tener un número mínimo de 10 insectos por replica (en lo posible y aconsejado es 25 insectos cada uno si hay disponibles), así como los controles y deberán realizarse tres réplicas de cada uno (mínimo).
- Se realizarán controles de insectos muertos cada 24 horas hasta 10 días posteriores y se comparará la mortalidad con los insectos no tratados o controles. Los ensayos deberán ser repetidos al menos tres veces en el tiempo (mínimo aceptable 2).
- Los hongos deberán ser re aislados a partir de los insectos muertos en medio de cultivo esterilizado (recomendable SDYA 25%) o bien, si no se observa esporulación externa, se deberán disecar y observar los tejidos bajo el microscopio óptico para verificar la causa de la muerte por la acción del hongo.

NOTA: Mediante este método no es posible estimar una concentración exacta de conidios aplicados por insecto, si se puede estimar en forma relativa.

Aplicación por pulverización. Suspensión de conidios

Bioensayo 1

Ejemplo de protocolo de bioensayo contra *Triaelurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae)

- a) Organizar una colonia de *Triaelurodes vaporariorum* en plantas de tomate.

- b) Cortar las hojas que presenten ninfas del IV estadio y pasarlas por agua destilada estéril.
- c) Remover cada una de las ninfas con una aguja entomológica y colocarlas sobre un portaobjetos limpio (10 ninfas por portaobjetos).
- d) Preparar una suspensión de conidios en Tween 80 (0.01%) a partir de un cultivo esporulado. Estimar la concentración de esa suspensión madre cuantificando el número de conidios en un hemocitómetro (Cámara de Neubauer), y a partir de esta diluir en forma seriada hasta obtener la concentración final deseada, un ejemplo puede ser 1×10^7 conidios/ml.
- e) Colocar 5 μ l de la suspensión de conidios sobre cada ninfa ubicada en el portaobjetos y dejar secar al aire bajo cámara de flujo laminar.
- f) Cada portaobjetos se ubicará en una cápsula de Petri de 100 mm de diámetro previamente esterilizada, en cuyo interior se colocará papel de filtro humedecido en agua destilada (cámara húmeda) y se incubará a 25 °C en oscuridad.
- g) Diariamente evaluar el número de adultos emergidos y el número de ninfas infectadas (registrar a las 48, 72, 120, 144 y 168 horas).
- h) Los hongos deberán ser re aislados a partir de los insectos muertos en medio de cultivo esterilizado (recomendable SDYA 25%) o bien si no se observa esporulación externa, se deberán disecar y observar los tejidos bajo el microscopio óptico para verificar la causa de la muerte por la acción del hongo
- i) Control: se colocan solo 5 μ l de Tween 80 (0.01%) sobre las ninfas. Deberían emerger la mayor cantidad de adultos.

Bioensayo 2

- a) Preparar una suspensión de conidios de *Metarhizium anisopliae* en Tween 80 (0.01%) a partir de un cultivo puro. Agregar Tween al cultivo y obtener los conidios por raspado con ansa de Drigalsky esterilizada. Cuantificar el número de conidios por mililitros presentes en la suspensión madre utilizando un hemocitómetro (Cámara de Neubauer). Luego realizar las diluciones seriadas pertinentes hasta obtener el número deseado de conidios por mililitros, en general es aproximadamente 1×10^7 o 1×10^8 con/ml.
- b) Homogenizar bien la suspensión en vórtex durante 2-3 minutos y aplicar mediante un pulverizador manual, o bien con algún aplicador adaptado para tal fin, sobre los insectos.

Bioensayo 3

Ejemplo de protocolo con *Aphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)

- a) A partir de una colonia de *Aphitobius diaperinus* seleccionar insectos adultos de la misma cohorte y similar tamaño y peso.

- b) Preparar una suspensión de conidios de la cepa del hongo seleccionada (*Metarhizium anisopliae* o *Beauveria bassiana*) en Tween 80 (0.01%) a partir de un cultivo esporulado de 15 días de incubación (concentración final 1×10^8 conidios/ml).
- c) Colocar 5 μ l de la suspensión de conidios con una jeringa Hamilton o bien con una micropipeta, sobre el dorso de cada uno de los insectos.
- d) Los tratamientos incluirán insectos infectados con los conidios fúngicos, insectos infectados con conidios fúngicos más tierra de diatomeas, insectos inoculados solo con tierra de diatomeas e insectos control (con el agregado de solo 5 μ l de Tween sin conidios a cada insecto).
- e) Otra opción será aplicar las suspensiones determinadas previamente sobre un papel de filtro ubicado en una caja de Petri (100 mm de diámetro), por donde se expondrán a caminar los insectos.
- f) Los insectos tratados serán acondicionados de a 5 en recipientes de plástico de 250 cc de capacidad con tapa ventilada (tela de voile) sin alimentar por 24 horas, y luego se les agregará la dieta correspondiente (harina de maíz) y se llevarán a incubar a 25 °C en oscuridad. Serán usados 20 insectos por tratamiento y con 3 repeticiones cada uno, más dos réplicas en el tiempo.
- g) Cada 24 horas y hasta 10 días post tratamiento los insectos serán revisados, en caso de detectar mortalidad será registrada y los insectos muertos serán acondicionados en cámaras húmedas en cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro conteniendo papel de filtro levemente humedecido con agua destilada.
- h) Una vez que se detecte la emersión del micelio sobre el cuerpo de los insectos tratados, aproximadamente 48-72 horas *post mortem*, será re-aislado el hongo en medio de cultivo (SDYA), y si el hongo inoculado se desarrolla esto será la comprobación experimental de los postulados de Koch.
- i) Los resultados de mortalidad serán analizados mediante análisis de varianza ANOVA y test de T de Student. Se estimará el Tiempo letal 50 (TL₅₀) para estimar agresividad de las cepas fúngicas utilizadas.

Aplicación por Inyección intrahemocélica

- a) Los cuerpos hifales o protoplastos fúngicos deberán ser cultivados en medio líquido y para la inyección se usarán cultivos de dos o tres días.
- b) Para preparar el material a inyectar, el cultivo debe ser lavado y centrifugado y, en el caso de cuerpos hifales o blastosporas pueden ser filtrados y el micelio lavado con agua destilada estéril antes de ser agregado a un volumen final de agua destilada, o bien puede ser sin preparación previa, esto depende del hongo del que se trate.

- c) Las suspensiones de cuerpos hifales, blastosporas o protoplastos serán inoculadas en el insecto a tratar mediante inyección intrahemocélica en cantidades (5 - 10 μ l) de acuerdo al tamaño del insecto en la base de una de las propatas. Es importante insertar el inóculo (suspensión fúngica) en el hemocele con cuidado especial de no invadir el intestino durante el proceso.
- d) Las microjeringas pueden estar adheridas a agujas utrafinas de vidrio o metal (en general se usan de metal).
- e) Se puede hacer en forma manual, pero lo ideal es utilizar un microinyector especial que dosificará con exactitud la cantidad de suspensión a ser inyectada en el insecto.
- f) Una vez inyectados los insectos pueden ser mantenidos bajo condiciones normales a ser establecidas de acuerdo al ensayo.

Aplicación *Per os*

Efecto del cebo formulado con hongos entomopatógenos sobre ninfas y adultos de *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae)

- a) Preparar el cebo con 6 g de comida para perros seca y triturada mezclada con 100 ml de agar-agua al 0,5%.
- b) Añadir 1ml de una suspensión de 1×10^9 conidios/ml a 4 g del cebo y colocar 4 ml de esta mezcla en placas de Petri (diámetro: 3,5 cm) esterilizadas. Para los controles usar los cebos sin aplicarles la suspensión fúngica.
- c) Exponer grupos de 10 adultos y de 10 ninfas de III estadio de *B. germanica* a estos cebos durante 72 horas. Colocar los insectos dentro de un recipiente de 250 cm³ con alimento y agua, que serán renovados cada dos días.
- d) Mantener los insectos tratados y controles en incubadora a 25 ± 1 °C, 70 ± 5 % HR y con un fotoperíodo de 12:12 luz /oscuridad.
- e) Controlar la mortalidad diariamente durante veinte días.
- f) Repetir el ensayo tres veces en diferentes tiempos.
- g) Las cucarachas muertas deben ser removidas diariamente y colocadas en cámaras húmedas para comprobar el desarrollo del hongo sobre el insecto.

Nota: Ejemplos para cada caso, por lo tanto las especies propuestas a utilizar en los bioensayos son sugerencias.

Bioensayos con bacterias entomopatógenas

Protocolo para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) y la potencia de formulados de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (B.t.i) y *Bacillus sphaericus* (Bs)

El principio de los bioensayos en los que se determina la potencia de los formulados y la concentración letal media (CL₅₀) se basa en la comparación de las mortalidades de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) producidas por el B.t.i, y de *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) producidas por Bs evaluado y el estándar correspondiente, IPS82 (B.t.i) y SPH88 (Bs) provisto por el Centro Internacional de *Bacillus* entomopatogénicos del Instituto Pasteur, Paris, Francia.

Se utilizan recipientes plásticos de 200 ml con 150 ml volumen final de agua deionizada. En cada recipiente se agregan 25 larvas de IV estadio temprano de *Ae. aegypti* y la cantidad suficiente de IPS82 para obtener concentraciones finales de 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.008 y 0.005 mg/ml, y aproximadamente 10 veces más concentrados de los formulados de B.t.i, considerando que los productos comerciales tienen entre 1200 y 600 UTI/mg .

Tres recipientes se colocan para cada concentración de los formulados y de IPS82, y para el control, el cual consiste en 150 ml de agua deionizada sin el agregado de B.t.i. No se agrega alimento a las larvas de *Ae. aegypti* durante la experiencia. Todos los ensayos se realizan a 27 ± 1 °C y fotoperíodo de 12:12 horas de luz: oscuridad en una cámara incubadora (marca Sematic, Mod. L-290).

La mortalidad se determina mediante la cuantificación de las larvas que permanecieron vivas a las 24 horas posteriores al tratamiento. Cuando se observan pupas se extraen y sus números se excluyen de los datos.

Cuando la mortalidad del control excede 5%, las mortalidades de los grupos tratados deben ser corregidas de acuerdo a la fórmula de Abbott. Pruebas con mortalidad en el control mayores a 10% se descartan. Tomando como base la CL₅₀ del estándar y de los formulados, se determina la potencia de los formulados. Para incrementar la precisión y exactitud los bioensayos son repetidos al menos 3 días diferentes simultáneamente con el estándar.

Las larvas utilizadas en los ensayos se obtuvieron de las colonias de *Ae. aegypti* (B.t.i) y *Culex pipiens* (Bs) que se mantienen en el Laboratorio de Biología y Control de Culícidos del CEPAVE utilizando métodos estándares para cría de mosquitos.

La elección de larvas tempranas de IV estadio es debido a que son más representativas del total de susceptibilidad de la población “blanco” y también son mucho más convenientes para el manipuleo comparado con larvas más jóvenes. Es muy importante usar una población homogénea de larvas de IV estadio tempranas, las que son obtenidas luego de 5 días de emergidas (de acuerdo a nuestro modo estandarizado de cría). Para las poblaciones de *Aedes*, la estandarización de larvas es posible de realizar con cierta facilidad debido al sincronismo del ciclo de *Ae. aegypti*. Los huevos son puestos sobre un trozo de papel de filtro (y este puede ser conservado por varios meses en una bolsa plástica sellada) y cuando es necesario tener larvas para ensayos, los papeles son sumergidos en agua de clorinada para la posterior eclosión. Después de 24 horas de eclosionados los huevos, las larvas de estadio I son transferidas a un recipiente (25 x 25 cm) con dos litros de agua de clorinada, con 500 a 700 larvas por recipiente. Cinco días después a 26 °C, se obtendrá una población homogénea de jóvenes larvas de IV estadio (de 5

días de edad y 4-5 mm de longitud). Se les provee de “pellets” de alimento para cobayos molido finamente, como alimento para las larvas.

La potencia de los productos de *B.t.i.* evaluados se determinó contra uno de referencia IPS 82 (cepa 1884) liofilizado en polvo sobre larvas jóvenes de IV estadio de *Ae. aegypti* (cepa Bora-Bora). El título de IPS82 fue asignado con 15000 ITU (international toxic units= unidades tóxicas internacionales) / mg de polvo sobre este insecto (De Barjac & Larget-Thiéry, 1984).

La potencia de los productos se determina de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Potencia muestra (UTI/mg)} = \frac{\text{CL50 estándar}}{\text{CL50 muestra}} \times \text{Potencia estándar (UTI/mg)}$$

Bioensayos con virus entomopatógenos (nucleopoliedrovirus, npv) sobre lepidópteros

Infección experimental de larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) o *Spodoptera frugiperda* mediante la contaminación superficial de la dieta artificial con una concentración conocida de cuerpos de inclusión de AgMNPV o SfMNPV, respectivamente

- Podemos partir de OBs purificados (protocolo a continuación) o de larvas infectadas maceradas en mortero.
- Homogeneizar las larvas infectadas en vórtex por 2 minutos y a partir de esta suspensión hacer diluciones seriadas. Realizar la cuantificación de los cuerpos de inclusión (OBs) utilizando un hemocitómetro: Cámara de Neubauer.
- Preparar una suspensión final de 1 ml de 1×10^6 OBs/ml.
- Colocar 1 ml de la suspensión del virus, preparada en el paso anterior, sobre un fragmento de dieta artificial (utilizar un cuadrado de aproximadamente 0.5 cm de lado) y colocar 5 larvas sobre la dieta artificial. Recordar que debemos realizar como mínimo tres réplicas por tratamiento en diferentes tiempos con sus respectivos controles.
- El control consiste en colocar 1 ml de agua destilada sobre la dieta artificial de *A. gemmatalis* y luego 10 larvas por recipiente.
- Colocar las larvas tratadas y controles en incubadora a 20 °C y observar cada 24 horas.
- Registrar los resultados observados hasta los 8 días post- tratamiento, incluyendo el total de larvas muertas para cada caso.

Otras metodologías utilizadas para bioensayos con virus:

Incorporar la suspensión viral, con OBs previamente cuantificada, sobre círculos (de un área conocida), de hojas de plantas de dieta natural (por ejemplo para el caso de orugas defoliadoras).

Importante: siempre usar lavandina para lavar el material que fue utilizado con virus y utilizar guantes de látex. Enjuagar pipetas, pinzas, etc. en lavandina durante 5 minutos y luego enjuagar en agua destilada. Debemos observar siempre primero los controles.

Bibliografía consultada / recomendada

- De Barjac, H. & Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique e serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. *Entomophaga*, 7, 5-31.
- Doberski, J. W. & Tribe, H. T. (1980). Isolation of entomogenous fungi from Elm Bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society* 74 (1), 95- 100.
- Caballero, P., Williams, T. & López Ferber M. (2001). Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de Plagas. Editorial Phytoma y Universidad Pública de Navarra, España 528 pp.
- Goettel, M. S. & Inglis, D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. En: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Lacey L. (ed.). Chapter V-3. Pp. 213-249.
- Landa, Z, Osborne, L., Lopez, F. & Eyal, J. (1994). A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control* 4, 341-350.
- Lane, B. S., Humphreys, A. M., Thompson, K. & Trinci, A. P. (1988). ATP content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as criterion of spore viability. *Transactions of the British Mycological Society* 90, 109-111.
- Muñoz, D., Martínez, Murillo, A., Ruiz de Escudero, R. & Villaplana L. (2001). Técnicas básicas para la caracterización de baculovirus. EN: “Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas”. Caballero, P., López Ferber, M. y Williams, T. Eds. Editorial Phytoma y Universidad Pública de Navarra, España. Capítulo 14: 479-516.
- Navon, A. & Ascher, K. R. S. (2000). *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodos*. CABI Publishing. Wallingford, UK, New York, USA.
- Papierok, B. & Hajek, A. E. (1997). Fungi: Entomophthorales. En: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Lacey L. (ed.). Chapter V-2. Pp. 187-211.

Los autores

Coordinadores

López Lastra, Claudia Cristina

Doctora en Ciencias Naturales. Licenciada en Biología (orientación Ecología) Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Profesora titular en la Cátedra de Patología de Insectos (FCNyM, UNLP). Investigadora Principal de CONICET, con lugar de trabajo en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE- CONICET-UNLP). Su área de investigación está enmarcada en la micopatología de insectos, uso de los hongos patógenos para control de insectos. E-mail: claudia@cepave.edu.ar

García, Juan José

Doctor en Ciencias Naturales. Licenciado en Biología (orientación Zoología) Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) Profesor adjunto en la Cátedra de Zoología General (FCNyM, UNLP). Investigador Principal de CIC-PBA, con lugar de trabajo en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE- CONICET-UNLP). Su área de investigación está enmarcada en la patología de insectos. E-mail: juan@cepave.edu.ar

Autores

D'Alessandro, Celeste Paola

Doctora en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Licenciada en biología Universidad Nacional de Mar del Plata. Investigadora con lugar de trabajo en la “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz “(ESALQ), “Universidade de São Paulo” (USP), en la ciudad de Piracicaba, São Paulo, Brasil. Su área de investigación está enmarcada en el área de patología de insectos y control microbiano de plagas agrícolas. E-mail: celed1881@gmail.com

Gutierrez, Alejandra Concepción

Doctora en Ciencias Naturales, Licenciada en Biología (orientación Zoología), Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Jefa de trabajos prácticos en la Cátedra de Patología de Insectos (FCNyM, UNLP). Investigadora asistente de CONICET, con lugar de trabajo en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE-CONICET-UNLP). Su área de investigación está enmarcada en el área de patología de insectos y control microbiano de plagas urbanas. E-mail: gutierrez@cepave.edu.ar

Hipperdinger, Marcela

Estudiante del último año de la carrera de Biología (orientación Botánica) de la FCNyM – UNLP. Personal técnico de apoyo (CPA) del CONICET, con lugar de trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET-UNLP). Fue ayudante de segunda *ad honorem* en la cátedra patología de insectos FCNyM-UNLP desde 2013-2017. Su área de trabajo es la preservación de cultivos microbianos. E-mail: marcehipper@gmail.com

Manfrino Romina Guadalupe.

Doctora en Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Licenciada en Biodiversidad y Profesora en Biología, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral. Investigadora asistente en CONICET, con lugar de trabajo en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE-CONICET-UNLP). Su área de investigación abarca los hongos patógenos de insectos. E-mail: manfrino@cepave.edu.ar

Mieli, María Victoria

Doctora en Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Licenciada en Biología (orientación Zoología) Ayudante Diplomada en el Curso de Artrópodos de Interés Médico y Veterinario, Departamento de Entomología-UNLP. Investigadora Independiente del CONICET, con lugar de trabajo en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). Su área de investigación está enmarcada en Patología de Insectos y Entomología Médica. E-mail: victoria@cepave.edu.ar

Muttis, Evangelina

Doctora en Ciencias Naturales. Licenciada en Biología (orientación Zoología), Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Becaria Posdoctoral del CONICET, con lugar de trabajo en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE- CONICET-UNLP). Su área de investigación está enmarcada en el estudio de los virus entomopatógenos. E-mail: emuttis@cepave.edu.ar

Toledo, Andrea Vanesa

Doctora en Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Licenciada en Biología (orientación Zoología). Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Entomología (FCNyM, UNLP). Investigadora (CONICET) con lugar de trabajo en el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Su área de investigación está enmarcada en Control Biológico de insectos plaga a través de la utilización de hongos patógenos. E-mail: atole-do@fcnym.unlp.edu.ar; avtoledo1975@gmail.com

Patología de insectos : metodologías y técnicas de laboratorio : un aporte al trabajo experimental / Claudia Cristina López Lastra ... [et al.] ; coordinación general de Claudia Cristina López Lastra ; Juan José García ; prefacio de Daniel R. Sosa Gómez. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2021.
Libro digital, PDF - (Libros de Cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-34-2022-5

1. Patologías. 2. Insectos. I. López Lastra, Claudia Cristina, coord. II. García, Juan José, coord. III. Sosa Gómez, Daniel R., pref.
CDD 595.70723

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2021
ISBN 978-950-34-2022-5
© 2021 - Edulp

n
naturales


Edulp
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA