

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


EduLP
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


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 7

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

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

Conservación de patógenos de insectos. Datos de colecta. Colecciones de cultivos. Métodos de preservación: Subcultivos; Agua destilada estéril; Preservación en papel de filtro; Silica-gel; Criopreservación; Liofilización. Ventajas y desventajas de los distintos métodos.

Introducción

Para conservar correctamente las cepas microbianas tenemos que asegurarnos que el cultivo sea axénico, evitando contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y que estas células permanezcan genéticamente estables (García López & Uruburo, 2000). Debemos encontrar el método de preservación más indicado para el microorganismo, y en lo posible seleccionar dos métodos diferentes.

Registro de los datos de campo para la recolección de los entomopatógenos

En el momento de la recolección, la información detallada debe ser registrada con respecto a:

- El insecto (especie, etapa, patología grave, comportamiento, ubicación en el medio ambiente);
- Planta huésped o hábitat;
- Prevalencia de la enfermedad (especificar si ocurrió una epizootia y además cuántos insectos enfermos se recolectaron);

- Coordenadas geográficas (GPS), elevación y condiciones climáticas locales (humedad y temperatura);
- Fecha de recolección y nombre de la persona que hizo el muestreo. En el caso de que no fuera la misma persona agregar el Nombre de quien legó el material (legit) a la colección de cultivos.

Información adicional relativa a un patógeno específico se puede consultar en Lacey, (2012). Los datos colectados en el campo son fundamentales para describir un microorganismo particular y al momento de querer preservar este microorganismo en una colección de referencia.

Colecciones de cultivos

La función primaria de una colección es el mantenimiento y suministro de cultivos, y la custodia de la documentación asociada a ellos (Kirsop *et al.*, 1991). Las colecciones de cultivos de microorganismos tienen gran importancia para la conservación del recurso genético y de la diversidad, constituyen fuentes de referencia, certificación, investigación y docencia. Asimismo, mediante estas colecciones se brindan servicios de asesoramiento y de transferencia del conocimiento científico y tecnológico al sector público y privado (Gutierrez *et al.*, 2017). La función principal de las colecciones es la conservación de cultivos microbianos axénicos, sin alteraciones genéticas o mutaciones, ni cambios morfológicos o fisiológicos. Las colecciones deben permitir la preservación de las cepas en un estado estable y asegurar su viabilidad a largo plazo (Smith & Onions, 1983). Las colecciones de cultivos deben disponer de un reglamento propio y de un manual de control de calidad, además deben establecer acuerdos de transferencia de materiales establecidos para las colecciones de cultivos (Davel, 2019). Para más información de las Normativas y funciones de las colecciones de microorganismos se puede consultar en la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC) y en la Federación Mundial de Colecciones de cultivos (WFCC). Por ejemplo la colección de referencia a nivel mundial de hongos entomopatógenos es ARS Collection of Entomopathogenic Fungi, cuyo acrónimo es ARSEF.

Métodos de preservación

En el caso de los hongos y de las bacterias entomopatógenas es importante evitar la pérdida de características tales como la virulencia, la capacidad de esporular en medio de cultivo y las características visuales del cultivo como el color y forma de la colonia. Pueden aparecer numerosos problemas durante la manipulación o durante el almacenamiento (mutación genética, pérdida de características, selección de poblaciones resistentes) hasta que una cepa se pierda por completo (Fisher & Garczynski, 2012). Otros parámetros pueden influir en la elección de una técnica en particular, como el costo, la infraestructura del laboratorio, el número de ce-

pas para almacenar, el manejo de la técnica, etc. Debemos recordar que ningún método es 100% confiable y cada técnica presenta ventajas y desventajas.

Los períodos de preservación pueden ser largos o cortos dependiendo de la técnica a emplear y del microorganismo a preservar. Períodos cortos: se emplean en cultivos durante intervalos cortos de tiempo, o cuando no se pueden emplear otros métodos (falta de equipos, recursos o debido a que el hongo o bacteria no resisten otros métodos). Períodos largos: existen varias opciones para el almacenamiento a largo plazo, todas se basan en disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y así poder mantenerlo viable por períodos prolongados de tiempo (Humber, 2012). A continuación presentamos algunos de los métodos más comunes utilizados para la preservación de entomopatógenos.

Períodos cortos

1- Subcultivos

Los cultivos se almacenan preferentemente en heladera a 4 °C, en tubos en estría, bien cerrados y durante periodos de tiempo que oscilan dependiendo de las especies. Las bacterias y los hongos corren mayor riesgo de contaminación y pérdida de ciertas características (virulencia), es un método que se recomienda de uso interno del laboratorio en el momento en que se utilizan ciertas cepas. En el caso de los hongos en particular, nuestra experiencia del laboratorio durante 30 años, hemos comprobado que este método de los repiques sucesivos no es recomendable para la preservación de hongos entomopatógenos, ya que se ha observado una disminución de la viabilidad y de la virulencia (Gutierrez *et al.*, 2017). En el caso de las bacterias el tiempo de preservación por éste método no debe ser mayor a 30 días.

2- Agua destilada estéril

Esta metodología se utiliza para hongos y también para bacterias, pero no en gran medida. Hay registros de hongos (no entomopatógenos) que fueron preservados en agua y permanecen viables durante 20 años (Hartung de Capriles *et al.*, 1989). Es útil en los casos en que los hongos no puedan ser preservados por métodos de congelación o liofilización como por ejemplo los Oomycetes (Clarck & Dick, 1974). Esta técnica requiere sólo de tubos o viales con tapa a rosca y agua esterilizada (puede usarse agua corriente, agua desionizada o agua destilada), el material se puede almacenar en heladera a 4 °C o bien a temperatura ambiente (Humber, 2012).

Preservación de hongos en agua destilada estéril:

1. Cortar con un bisturí estéril cubos de 1 cm³ de un cultivo fúngico esporulado.
2. Colocar 4-5 cubos dentro de un tubo de polipropileno (15 ml) esterilizados en autoclave con 10 ml de agua destilada estéril.
3. Cada tubo se conserva a 4 °C.

3- Preservación en papel de filtro

Los cultivos de hongos y bacterias se pueden conservar en heladera a 4 °C. El tiempo promedio de preservación registrado en nuestro laboratorio, para los hongos entomopatógenos, ha sido de dos años.

Protocolo de preservación de esporas de *Bacillus* spp. en papel de filtro adaptado de Fisher & Garczynski (2012)

1. Aislar una colonia de una placa de agar nutritivo e inocular 10 ml de medio caldo nutritivo. Incubar el tubo con agitación durante 48 horas a 30 °C. Verifique la esporulación del cultivo.
2. Pasteurización: caliente el cultivo a 80 °C durante 20 minutos para seleccionar las esporas.
3. Coloque asépticamente una gota de cada cultivo calentado en un trozo de papel de filtro estéril, previamente colocado en un tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf (1.5 ml).
4. Deje que el papel de filtro se seque en el tubo durante 3 semanas a 37 °C.
5. Selle el tubo en condiciones estériles con Parafilm y rotular fecha y cepa.
6. Almacene los tubos a 4 °C hasta su uso.
7. Para recuperar el papel de filtro, abrirlo en un ambiente estéril (bajo cámara de flujo laminar o en mesada previa limpieza con alcohol y mechero de Bunsen encendido) y colocar el papel de filtro en el medio apropiado para el crecimiento. Estas esporas pueden permanecer viables por periodos prolongados, en nuestro laboratorio han superado los 10 años (datos no publicados).

Protocolo para preservación de hongos entomopatógenos en papel de filtro

El protocolo de preservación de cultivos de hongos entomopatógenos en papel, modificado y adaptado en el laboratorio de hongos entomopatógenos del CEPAVE, surge a partir de la técnica descrita por Fong *et al.* (2000).

4- Sílica gel

Para el caso de los cultivos de hongos la preservación de esporas en cristales de sílica gel anhidra sin indicador de color, se debe realizar en freezer -20 °C. Este método es poco costoso, simple y confiable para los hongos entomopatógenos. Es útil solo para bacterias aerobias y hongos que puedan crecer en medios sólidos.

Protocolo de preservación de esporas de hongos en sílica gel

1. Llenar frascos de vidrio de 25 x 200 mm con tapa a rosca con un tercio de cristales de sílica gel incoloro grado 40, y esterilizar los tubos conteniendo la sílica gel en estufa a 160-180 °C durante 1 a 6 horas.

2. Partir de un cultivo esporulado, colocar los conidios en 1 a 5 ml de agua destilada estéril o en una solución de leche descremada 5-7% (v/v), cerrar y agitar los tubos para formar una suspensión homogénea.
3. Colocar 1 ml de la suspensión en los cristales fríos de sílica gel, preparados previamente, rotar y agitar los tubos lentamente. Mantener los tubos a temperatura ambiente durante varios días y agitarlos periódicamente hasta que los cristales se separen y hayan absorbido el agua.
4. Almacenar a -20 °C. Es necesario controlar la viabilidad de las esporas entre 1 y 2 semanas después de realizado el procedimiento.

Períodos largos

5- Criopreservación: Hongos, bacterias y virus

Es el proceso en el cual las células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 °C y -196 °C, y se basa en la paralización del metabolismo celular por la disminución del agua disponible. Las células deberán ser suspendidas directamente en un agente crioprotector. Se pueden usar muchos crioprotectores para prevenir la formación de cristales de hielo durante el congelamiento, siendo algunos de los más usados glicerol (en diferentes porcentajes de acuerdo a si se trate de bacterias u hongos), y dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros ejemplos.

Glicerol

Protocolo para preservación de bacterias en glicerol 20% por congelamiento freezer -80 °C adaptado de Fisher & Garczynski, 2012

1. Aislar una colonia de una placa de agar nutritivo e inocular 10 ml de caldo de cultivo.
2. Incubar el tubo en agitación a 250 r.p.m. a 30 °C por 24 horas.
3. Transferir 800 µl del cultivo de bacterias a crioviales o en su defecto tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf (1.5 ml) que contengan 200 µl de glicerol estéril 10% (el glicerol actúa como un crioprotector). Cerrar tubo con Parafilm.
4. Pasar por vórtice para asegurar una mezcla uniforme.
5. Estos tubos se deben congelar inmediatamente a -80 °C.

Protocolo para preservación de cultivos fúngicos en glicerol 10%

1. A partir de un cultivo fúngico esporulado cortar cubos de 0.5 cm³.
2. Transferir 2-3 de estos cubos a un tubo de microcentrífuga estéril tipo Eppendorf (1.5 ml) conteniendo glicerol 10% esterilizado previamente en autoclave.
3. Estos tubos deben preservarse a -20 °C. Dependiendo de la especie fúngica pueden mantenerse hasta 1 año)

Para el método de preservación en freezer -70 o -80 °C se debe proceder de la siguiente manera:

1. Colocar bloques de cultivos de hongos (esporulados) en su medio de cultivo original o bien suspensiones de esporas/ protoplastos, en recipientes esterilizados de plástico resistentes a la congelación. Se agregaran previamente 1.5 ml de glicerol estéril. Por tubo colocar entre 3-6 muestras y rotular.
2. Colocar los tubos en recipientes especiales, en conservadores de frío de policarbonato (Nalgene®: Mr. Frosty) o bien en recipientes plásticos para freezer (los tubos se pueden colocar en un telgopor con perforaciones, el telgopor no debe estar en contacto directo con el isopropanol).
3. En estos recipientes, conteniendo el isopropanol (250 ml), colocar los tubos y ubicarlos en heladera toda la noche (4 °C).
4. Luego pasar a freezer -70 °C durante 24 horas.
5. Sacar los tubos con los cultivos de los recipientes que contienen isopropanol y dejarlos en cajas de cartón en el freezer -70 °C durante el tiempo deseado (López Lastra *et al.*, 2001).

Es importante preparar varios lotes a congelar ya que varios pasos de congelación y descongelación reduce la viabilidad de las bacterias y los hongos preservados. Por esto recomendamos que si descongela una muestra, ya no se debe volver a preservar.

Preservación por congelamiento en ultra frío a -196 °C

Este método es el más complejo en criopreservación, se debe usar un control de temperaturas mediante series programables y computarizado, y esto será seguido por un almacenaje a -196 °C, inmerso en nitrógeno líquido. Este sistema preserva a largo plazo tanto bacterias como hongos entomopatógenos, y la conservación podría prolongarse por muchos años, siendo este un método eficiente, pero es muy costoso.

En el caso de la preservación de virus, las partículas virales incluidas (OBs) están protegidas por estructuras proteicas, por lo que son muy estables bajo condiciones de laboratorio, podrán ser preservados en agua bi destilada o bien en buffer fosfato (PBS) a temperatura ambiente en un gradiente de $4 - 20$ °C o incluso preservarse a bajas temperaturas. Las partículas virales purificadas de todas las familias virales se almacenan a -80 °C o bien bajo ultra frío en nitrógeno líquido a -196 °C para reducir o evitar la pérdida de virulencia. Los virus de la Familia Iridoviridae conservados a -70 °C pierden progresivamente la capacidad de infectar, siendo muy baja después de los seis meses (Muttis, 2017).

6- Liofilización

La conservación por liofilización es un método estándar usado para virus, bacterias y hongos. El mismo consiste en extraer toda el agua de un cultivo y preservar el material en ampollas cerradas al vacío. La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de la mayoría de los microorganismos y es la técnica principal utilizada por la mayoría de las colecciones de cultivos. La principal ventaja es que los tubos son fácilmente manteni-

dos aún a temperatura ambiente, se realiza con relativa rapidez, los tubos ocupan poco espacio de almacenamiento y son de fácil envío. La desventaja es el costo del equipo y el consumo energético. Existen diferentes protocolos para liofilizar, algunos se detalla en Lacey (2012).

El efecto de los métodos de preservación debe ser evaluado para cada uno de los grupos de patógenos, por ejemplo para hongos y bacterias, la capacidad de esporular, su pureza y la viabilidad, es decir, la capacidad de germinación de las esporas. Al probar un método de preservación debemos evaluar la viabilidad del cultivo preservado a los 15 días, 3 meses, 6 meses, 1 y 2 años en lo posible.

Si queremos obtener más información de los diferentes métodos de preservación de entomopatógenos podemos consultar: para hongos López Lastra & Gutierrez (2019) y para bacterias, virus y hongos Lacey (2012).

Tabla 1. Métodos de preservación más frecuentes en bacterias (B), hongos (H) y virus (V).

Método	Ventaja	Desventaja	Tiempo promedio de preservación
Subcultivos–transferencias periódicas	Económico	Pérdida de virulencia y capacidad de esporular. Mutaciones	15 días-2 meses (H) 1-2 años (H) 2-3 semanas (B)
Papel	Efectivo, simple y económico Útil para bacterias esporuladas	Viabilidad a corto-mediano plazo	1-2 años (H)* meses a 2 años (B)
Agua destilada estéril	Económico y simple	Sólo corto plazo. Problemas con la viabilidad de las esporas	1 año (López Lastra <i>et al.</i> , 2002)
Sílica gel	Económico, simple, no requiere equipamiento costoso	Solo bacterias esporuladas y hongos que crecen en medio sólido. El almacenaje a largo plazo depende del sistema de cierre de los frascos	>10 años (Montesinos <i>et al.</i> , 2015) (H) meses a 2 años (B)
Freezer -20 °C	No recomendable para algunos hongos EP	Viabilidad a corto plazo (formación de cristales de agua). Requiere la correcta elección del crioprotector	1-2 años* (H) 2 meses a 5 años (B) años (V)
Freezer -70 o -80 °C	Muy efectivo a largo plazo	Es costoso el equipamiento, su mantención y el material a utilizar	Variable, en general 5 a más años (H, B, V)
Ultracongelación a -196 °C en nitrógeno líquido	Es el mejor método para los hongos EP a largo plazo	Costoso equipamiento y mantención del mismo; muy demandante en tiempo y dedicación especializada	Registro de 30 años (H, B, V)
Liofilización	Adecuado para hongos EP salvo que tengan mucho contenido de agua en sus células o requisitos especiales. Asegura la pureza, viabilidad y estabilidad	Es costoso el equipamiento, mantención y material para envasado. Requiere una preparación especial. Algunos aislamientos no sobreviven el proceso	Largo plazo (H, B, V); para virus se refieren hasta 5 años (Williams & Cisneros, 2001)

*datos obtenidos de la colección de hongos entomopatógenos (EP) y simbiontes de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina (no publicados).

Bibliografía consultada / recomendada

- Clark, G. & Dick, M. (1974). Long- term storage and viability of aquatic Oomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 63, 611-612.
- Davel, G. (2019). Colecciones de cultivos microbianos, cap. 10 (pp.179-191). En: Micopatología de artrópodos, Eds. López Lastra y Lecuona. Editorial INTA, ISBN 978-987-521-975-5.
- Fong, Y. K., Anuar, S., Lim, H. P., Tham, F. Y. & Sanderson, F. R. (2000). A modified filter paper technique for long term preservation of some fungal cultures. *Mycologist*. 14, 127-30.
- Fisher, T. W. & Garczynski S. F. (2012). Isolation, culture, preservation, and identification of entomopathogenic bacteria of the Bacilli. In: (Ed. Lacey L). *Manual of Techniques in Invertebrate pathology*, 2nd edition. (pp.75-99). San Diego, EEUU. Ac. Press.
- García López, M. D. & Uruburu Fernández, F. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*. 2000; 30: 12-16.
- Gutierrez, A. C., Tornesello-Galván J., Manfrino, R. G., Hipperdinger, M., Falvo, M., D'Alessandro, C. P. & López Lastra C. C. (2017). Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP) La Plata, Argentina. *Revista argentina de Microbiología* .49 (2), 183-188.
- Hartung de Capriles, C. Mata, S. & Middelveen, M. (1989). Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia* 106, 73-80.
- Humber R.A. (2012) Preservation of entomopathogenic fungal cultures. In: (Ed. Lacey L). *Manual of Techniques in Invertebrate pathology*, 2nd edition. (pp. 317-327). San Diego, EEUU. Ac. Press.
- Kirsop, B. E. Service collections: their functions. En Kirsop, B. E. & Doyle, A., eds. *Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods*. 2 ed. London: Academic Press 1991:520.
- Montesinos-Matías R., Ayala-Zermeño, M. A. & Berlanga-Padilla A. M. (2015). Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. SENASICA. Tecmán, Colima, México. Pp. 59. ISBN: 978-968-5384-08-7.
- Muttis, Evangelina. Virus patógenos de Culícidos: diversidad, patología, transmisión y espectro hospedador. Tesis doctoral UNLP-FCNyM, (2017). SeDiCi. <http://naturalis.fcny.unlp.edu.ar/id/20171005001551>
- Lacey, L. *Manual of Techniques in Invertebrate pathology*, 2nd edition. (2012). pp. 513. San Diego, EEUU. Ac. Press.
- López Lastra, C. C. & Gutierrez, A. C. (2019). Métodos de preservación de cultivos de hongos entomopatógenos, cap. 9 (pp167-178). En: Micopatología de artrópodos, Eds. López Lastra y Lecuona. Editorial INTA, ISBN 978-987-521-975-5.
- López Lastra, C. C., Hajek, A. E. & Humber, R. A. (2001). Effects of two cryopreservation techniques on viability and pathogenicity of Entomophthoralean fungi. *Canadian Journal of Botany*. 79, 861-864.

- López Lastra, C. C., Hajek, A. E., & Humber, R. A. (2002). Comparing Methods of Preservation for Cultures of Entomopathogenic Fungi. *Canadian Journal of Botany*. 80:1126-1130.
- Smith D. & Onions A. H. S. (1983). The preservation and maintenance of living fungi. Slough, Reino Unido: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1983. p. 51.
- Williams, T. & Cisneros, J. (2001). Formulación y aplicación de los baculovirus insecticidas. En: Caballero, López Ferber & Williams Eds. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Capítulo 10 (313-372 pp) Ed. Phytoma y Universidad Pública de Navarra, España.