

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

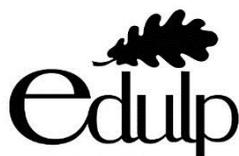
PATOLOGÍA DE INSECTOS
METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO.
UN APORTE AL TRABAJO EXPERIMENTAL

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 diagnóstico, 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

Prefacio de los autores

Desde el año 2001 en que fue aprobada esta materia para su dictado por la Facultad de Ciencias Naturales y Museo y continuando hasta el presente 2020, con un total de 19 años desde su inicio, fue dictada esta asignatura como materia optativa de grado y de posgrado. Asimismo, como cursos de posgrado relacionados tanto en el país como en países vecinos (Uruguay y Brasil) en numerosas ocasiones.

Esta asignatura teórico práctica es fundamentalmente experimental y ha sido siempre el objetivo final que los alumnos tengan un parámetro de como elaborar los informes y que experimentan la realización de todas las etapas del trabajo de laboratorio.

La materia ha sido dictada en Universidades de otros países pero nunca como tal en la Argentina, por ende la bibliografía específica y general está en su mayoría escrita en otros idiomas (especialmente en inglés) y la escasa literatura en español está poco actualizada.

Por otra parte y debido a que la materia es particularmente producto de la experiencia en investigación de todo el plantel docente, y por tantos años de trabajo en investigación sumado a experiencias de becas en el exterior y proyectos de cooperación bilaterales, hemos recabado mucho material de protocolos y metodologías, de la misma experiencia del dictado de la materia que se va actualizando y renovando año a año, y del enriquecimiento de los tesisistas y de alumnos que han cursado la misma. Esta es una asignatura muy abarcativa, con una amplia temática y muy específica para cada uno de sus diferentes aspectos.

Por todo lo antes expuesto hemos decidido presentar este material actualizado y compaginado con una orientación metodológica de apoyo, en base de los protocolos seguidos en nuestro laboratorio así como de otros que fueron adaptados de otros laboratorios y universidades de varias partes del mundo. El objetivo principal, y al cual nos hemos abocado en este libro, es poder reunir toda la información actualizada y transferir a través de esto más de 30 años de experiencia en investigación sobre el tema y 19 en la docencia en esta asignatura. El objetivo principal de este libro es dar a conocer el estado actual del estudio de los patógenos de insectos, su taxonomía y enfoques para el uso en control microbiano, metodologías de manejo, preservación y aplicación.

Prefacio invitado Dr. Daniel R. Sosa Gómez

En este libro esta vertida la experiencia y el conocimiento absorbido y condensado por los editores/autores a través de los años y a través del pasaje por diferentes lugares, que acompañé casi simultáneamente, como el Departamento de Entomología de la Universidad de Florida, Gainesville, Florida, la Unidad de Plantas, Suelos y Nutrición del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, el Departamento de Entomología de la Universidad de Cornell y el Instituto Boyce Thompson, en Ithaca, Nueva York o por nuestros fortuitos encuentros en la Reuniones de la Sociedad de Patología de Invertebrados.

A pesar de la importancia de los patógenos de insectos en el campo del control biológico con microorganismos, en Argentina se cuenta muy pocos libros en castellano destinados a estudiantes de graduación, post-graduación y a profesionales que desean nutrir sus conocimientos en este campo de la investigación, producción, industrialización y uso de agentes de control constituidos por microbios.

El libro ha sido elaborado en su totalidad por nueve autores argentinos versados en enfermedades de insectos y representa una importante contribución para estimular, capacitar y actualizar durante el proceso de formación de estudiosos en esta área.

El problema universal de contaminación sin término, exige el uso de agentes de control extremadamente selectivos (baculovirus son destinadas a controlar una única especie de insecto) para el control de plagas agrícolas y de importancia médica. La expansión de uso de estos agentes, que carecen de efectos indeseables, solo es posible con sólidas bases en la generación de conocimiento y su difusión, propósitos de este libro.

El control de plagas con microorganismos ha dejado de ser potencial para tornarse realidad en el control de diversas plagas de importancia económica, como orugas de la soja, del algodón, del maíz, de la yerba mate, chicharritas, psílidos, chinches de encaje, especies forestales y algunas especies de coleópteros. En todos los casos sin impacto ambiental, sin consecuencias negativas para el hombre o para otras especies de artrópodos. La patología de insectos y de ácaros, así como el control microbiano, constituyen un campo merecedor de esfuerzo e inversiones por su potencial de utilización, por su trascendencia económica y por el beneficio ambiental para el país.

Esta obra, proporcionará conocimientos básicos para la colecta e identificación de grupos taxonómicos. Abordará aspectos de biología y ecología, indicará métodos de preservación y de bioensayos para entender las interacciones patógeno – huésped. Proveerá protocolos para la elaboración de medios de cultivo, fijadores, colorantes, apropiados para cada grupo

de microorganismo, lo que facilitará la rutina de los laboratorios de investigación e industriales y permitirá concretizar estudios para entender el complejo mundo de los patógenos y simbioses de ácaros e insectos.

Dr. Daniel R. Sosa-Gómez

Investigador de Embrapa (Londrina, Brasil), profesor da Universidad Federal de Paraná, Curitiba y de la Universidad Estatal de Ponta Grossa, en Paraná, en Brasil.

CAPÍTULO 1

Historia y alcances de la Patología de Insectos

Claudia C. López Lastra

Historia de la patología de insectos. Aportes importantes de los primeros estudios sobre la temática. Recopilación de las referencias sobre los distintos grupos de patógenos: virus, bacteria, hongos, protozoos y nematodos. Grupos de investigación actuales en la Argentina. Definición de patología de insectos y sus implicancias e incumbencias. Relaciones con otras disciplinas. Usos y alcances.

Historia de la patología de insectos

Los insectos y otros artrópodos pueden llegar a padecer enfermedades causadas por patógenos, entre estos se destacan los hongos. Tanto en ambientes naturales como en crías en laboratorio los insectos pueden llegar a ser infectados por estos microorganismos. Los hongos entomopatógenos pueden ser utilizados para el control microbiano de insectos plaga y vectores, existiendo muchos productos registrados a nivel comercial en el mundo en base de estos organismos.

Introducción a la historia de los patógenos de insectos

Sobre este tema algunas de las referencias de libros publicados con capítulos sobre entomopatógenos y tratados sobre estos organismos fueron citados (Boucias & Pendland, 1998; Hajek, 2004; Lacey, 2012; Mc. Coy *et al.*, 1988; Tanada & Kaya, 1993 Vega & Blackwell 2005).

En Brasil el Dr. Sergio Alves, de la FEALQ, fue uno de los pioneros especialistas más destacados en el campo de la patología de insectos (si bien con principal foco en los hongos entomopatógenos) habiendo publicado numerosos artículos y libros, siendo orientador de gran número de los especialistas actuales de Brasil y de la Argentina (Alves 1986, 1998; Alves y Lopes, 2008).

Una amplia reseña de la historia de investigaciones sobre entomopatógenos a nivel mundial fue publicada en el marco de una actualización sobre la historia de la patología de insectos (Castrillo *et al.*, 2005; Lord, 2005). En 1996 fue publicado un libro sobre Control

microbiano (Lecuona, 1996) donde se enfatizan todos los patógenos de insectos, con un abordaje al control microbiano de insectos, además, y en lo que respecta en exclusiva a los hongos patógenos de artrópodos, fue actualizado su abordaje y estudio (López Lastra y Lecuona, 2019) por lo cual en este libro no profundizaremos en ese grupo en particular en la historia de las investigaciones.

Breve reseña histórica de la patología de insectos

- 335 - 322 a. C. Aristóteles. Historia Animalium. Enfermedades de abejas.
- 1726. R. A. de Reaumur, primera cita del hongo patógeno *Cordyceps* en insectos (Lepidoptera).
- 1808. P.H. Nysten publicó el primer tratado de enfermedades de insectos: “Recherches sur le maladie de vers a Soie” sobre el gusano de seda.
- 1826: W. Kirby publicó un capítulo “Diseases of Insects” (Kirby and Spence) en: An Introduction to Entomology.
- 1834. A. Bassi demostró experimentalmente que el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912 era el causante de una enfermedad infecciosa en el gusano de seda llamada “muscardina”. Publicó en 1835: “Del mal del Segno, Calcinaccio o Moscardino” sobre enfermedades del gusano de seda. Fue considerado el fundador de la patología de insectos / también compartido según otros autores con L. Pasteur.
- 1847. C. Robin publica una importante revisión sobre hongos entomógenos.
- 1856. Maestri, A. y E. Cornalia publican resultados sobre descripciones de los cuerpos polihédricos del virus causante de la enfermedad “jaundice” en el gusano de seda.
- 1865- 1870.- L. Pasteur investigó sobre las enfermedades del gusano de seda conocidas como “pebrina” (microsporidios) y “flacherie” (bacterias). Publicó en 1870 “Etudes sur le maladie de vers au soie”.
- 1867. A. Bechamp identificó correctamente los corpúsculos de la pebrina como causada por esporos de *Nosema bombycis* Naegeli
- 1879. Elie Metschnikoff (Rusia) publicó un importante trabajo sobre la “muscardina verde” causada por el hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 en el coleóptero *Anisoplia austriaca* (Herbst, 1783).
- 1885. F.R. Chesire y W.W. Cheyne describen a *Bacillus alvei* Cheshire & Cheyne 1885 como el causante de la enfermedad “foulbrood” (loque europea) en abejas.
- 1887- 1898. Forbes, S. A. y Snow, F. H., en EEUU intentan controlar la “chinche verde” mediante el uso de *Beauveria globulifera* (Speg.) y estudian otros aspectos de control microbiano.
- 1888. R. Thaxter publicó sus monografías sobre Entomophthoraceae (hongos patógenos de insectos) y luego sobre Laboulbeniomyces (1896 - 1931).
- 1892. Cooke publicó su libro sobre hongos entomógenos.

- 1894 - 1898. G. Bolle asoció correctamente los cuerpos polihédricos de los virus a la causa de la enfermedad “jaundice “en el gusano de seda.
- 1917. Lab. de estudios sobre control del escarabajo japonés. New Jersey EEUU. Se identifican y obtienen cultivos in vivo de las bacterias causantes de la enfermedad lechosa tipo A y B, causadas por *Bacillus popilliae* Dutky, 1940 y *B. lentimorbus* Dutky, 1940 respectivamente. Se elabora el primer producto formulado a partir de la tipo A, que se llamó comercialmente Doom.
- 1930. R. W. Glaser estudió los nematodos de insectos *Steinernema glaseri* Steiner que infectaban al escarabajo japonés *Popillia japonica* Newman 1841 en EEUU.
- 1933. Paillot publicó “L ´infection chez les insects” importante tratado de enfermedades de insectos.
- 1945. Se estableció en Berkeley, California el laboratorio de patología de Insectos dirigido por el profesor Harry Smith, quien originó la División de Control Biológico.
- 1945. Eduard Steinhaus hizo importantes aportes sobre virus y bacterias de insectos: descubrimientos destacados sobre *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 y dictó los primeros cursos de Patología de insectos.
- 1957. Tanada, en Hawai y Hall en 1962 en Riverside, California otros cursos. Steinhaus fue considerado como el padre de la moderna Patología de insectos y de la de invertebrados por sus numerosas contribuciones y por establecerla como una disciplina viable y distinta. (Steinhaus, 1949, 1953, 1963; Tanada & Kaya, 1993; Lord, 2005.)

Definición de patología de insectos y sus implicancias e incumbencias. Relaciones con otras disciplinas. Usos y alcances

Patología

Es la ciencia biomédica o especialidad médica que estudia las causas, desarrollo y efectos de una enfermedad, así como la enfermedad en sí y los cambios estructurales que produce esa enfermedad. Concierno a los niveles desde bioquímicos y diferenciales así como también a alteraciones morfológicas gruesas, visibles a “ojo desnudo”. (Concise medical dictionary, 2014).

Aplicaciones

Biología, medicina, agricultura, entomología, economía, epizootiología, bioquímica.

Áreas de estudio

Investigación básica
Molecular

Celular

Nivel de organismo

Aplicaciones en otras áreas y disciplinas

Control de insectos. Protección de insectos. Manejo integrado de plagas. Farmacología. Ecología, Fisiología de insectos, Toxicología, Microbiología, Bacteriología, Micología. Bioquímica, Nematología, Patología, Parasitología, etc.

Ejemplos de usos:

- Desarrollo de Baculovirus de insectos como vectores de expresión de genes.
- Producción de compuestos antimicrobianos (uso en farmacia).
- Anticuerpos, factores inmunes, interferones, vacunas.
- Estudios de patología/ inmunología de insectos: desarrollo de modelos para organismos superiores.

Bases de la investigación en la Patología de insectos (Steinhaus, 1960)

1. Reconocimiento e importancia de las enfermedades no infecciosas y de los disturbios causados por anomalías en la dieta; trastornos fisiológicos y metabólicos; injurias físicas y químicas; parásitos y depredadores.
2. Resolución de los métodos de tratamiento y eliminación de enfermedades en insectos benéficos.
3. Mejor conocimiento de varios aspectos de la vida de los insectos, de la influencia mutua de las relaciones entre microorganismos e insectos.
4. Conocimiento de los mejores métodos de producción masiva de los patógenos de insectos. Desarrollo de métodos específicos efectivos para eliminar plagas.
5. Investigar sobre los mecanismos de la enfermedad e infección en insectos para complementar el conocimiento de síntomas de enfermedades en humanos.

Bibliografía consultada / recomendada

- Alves, S.B. (1986). *Controle microbiano em Insetos*. 407 p. San Pablo, Brasil: Ed. Manole.
- Alves, S.B. (1998). *Controle Microbiano de Insetos*. 1163 p. Piracicaba, San Paulo, Brasil: Fundação Estudios Agrarios Luis de Queiroz FEALQ.
- Alves S.B. & R.B. López. (2008). *Controle microbiano de pragas na America Latina: avanços e desafios*. 414 p. Piracicaba, San Pablo, Brasil.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C. (1998). *Principles of Insect Pathology*. 550 pp. Boston. United Kingdom. Kluwer Academic Publ.
- Castrillo, L. A., Roberts, D.W. & Vandenberg, J.D. (2005). The fungal past, present and future: Germination, ramification and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 46-56.

- Concise medical dictionary 2019 Oxford University Press, Oxford, Uk 601 pp. DOI 10.1093/acref (9780199557141.001.0001)
- Hajek, A.E. (2004). *Natural Enemies. An Introduction to Biological Control*. 378 p. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press.
- Lacey, L. (2012). *Manual of techniques in Insect Pathology*. 483 p. San Diego, EEUU. Academic Press.
- Lord, J.C. (2005). From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 19-29.
- Lecuona, R.E. (1996). *Microorganismos patógenos empleados en el control de insectos plaga*. 338 p. Mariano Max, Buenos Aires, Argentina.
- Steinhaus, E.A. (1949). *Principles of Insect Pathology*. 757 p. New York, EEUU. Mc Graw-Hill.
- Steinhaus, E. A. (1956). Microbial control –the emergence of an idea- A brief history of insect pathology through the nineteenth century. *Hilgardia*, 26, 107-160.
- Steinhaus, E.A. (1963). *Insect Pathology: An Advanced Treatise*. (pp 1-27). Academic Press, Inc. New York, EEUU.
- Steinhaus, E. A. & Martignoni, M. E. (1970). *An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology*. Pacific Northwest Forest and Range Experimental Station Portland: USDA Forest Service.
- Tanada, Y & Kaya, H.K. (1993). *Insect Pathology*. 666p. Academic Press, New York, EEUU.
- Vega, F. E. & Blackwell M. (2005). *Insect Fungal Associations, ecology and evolution*. (pp 333). Oxford University Press, New York, USA.

CAPÍTULO 2

Patógenos de insectos

Claudia C. López Lastra y Juan José García

Enfermedad. Concepto de enfermedades microbianas y amicrobianas. Clasificación de enfermedades. Tipos de patógenos. Signos, síntomas y síndrome. Definiciones de: infectividad, patogenicidad, virulencia, agresividad. Vías de entrada al hospedador, tipos de transmisión. Diagnóstico. Postulados de Koch. Interacciones: sinergismo y antagonismo.

Enfermedad

“Es el cambio del estado de salud o normalidad. Es el resultado de una injuria que causa que algo funcione mal en el insecto”. (Steinhaus & Martignoni, 1970).

Enfermedades amicrobianas

Pueden ser causadas por:

- Injurias mecánicas: distensión, traumas.
- Agentes físicos: temperatura (alta, baja), humedad relativa, radicación, ausencia o exceso de gases.
- Agentes químicos: toxinas o venenos de plantas
- Factores genéticos
- Nutrición
- Disturbios hormonales

“La enfermedad no infecta al insecto. Un organismo patógeno infecta al insecto y esa infección es expresada como enfermedad”.

Enfermedades microbianas

Los microorganismos patógenos invaden y se multiplican en un insecto y se esparcen infectando a otros insectos sanos. Los patógenos son transmitidos a otros insectos por contacto o ingestión, por vectores, o por transmisión de los padres a la siguiente generación.

Clasificación de las enfermedades

1. **Por la presencia o ausencia de microorganismos:** (a) microbianas, (b) amicrobianas
2. **Por la extensión:** (a) local, (b) focal, (c) sistémica,
3. **Localización:** (a) intestinal, (b) cuerpo graso, (c) sangre, (d) de la hipodermis
4. **Curso:** (a) crónica, (b) aguda, (c) latente
5. **Recurso o fuente del agente microbiano:** (a) exógeno, (b) endógeno, (c) idiópático, (d) oculto
6. **Tipo de agente causal o etiológico:** (a) bacterias, (b) virus, (c) hongos, (d) protozoos, (e) nematodos
7. **Distribución o prevalencia de la enfermedad:** (a) esporádica, (b) enzoótica, (c) epizootica
8. **Métodos de transmisión:** (a) contacto directo, (b) *per os* (por ingestión), (c) vectores, (d) *transovum*, (e) transovárica

Esta clasificación corresponde a los descrito previamente (Boucias & Pendland, 1998)

Definiciones importantes

Infectividad: “Capacidad de un organismo de producir infección.” (Tanada & Kaya, 1993, Shapiro Ilan *et al.*, 2005, Onstad *et al.*, 2006).

Virulencia: Es el poder de un microorganismo de producir enfermedad. Es cuantificable. Es una variable que puede ser intensificada o reducida.

Patogenicidad: La diferencia con virulencia es que la patogenicidad es usada en el sentido de grado de patogenicidad dentro de un grupo o entre las especies, y que es cualitativa.

Agresividad: Es una variable cuantitativa que se estima comparando el Tiempo Letal 50 o 90 (TL₅₀, TL₉₀) entre aislamientos o cepas fúngicas (Lecuona, 1996).

Atenuación: Proceso de disminución de la virulencia o de la capacidad de un patógeno para causar enfermedad.

Inmunización: Incremento de la resistencia a un patógeno por el hospedador.

Signo: Anormalidad física, morfológica o estructural. Ejemplos: cambios de coloración, malformaciones en el tegumento o en apéndices.

Síntoma: disturbio funcional (fisiológico) o del comportamiento. Ejemplos: movimientos anormales, convulsiones, respuestas a estímulos digestivos, diarrea, vómitos, parálisis, etc.

Síndrome: grupo de signos y síntomas característicos de una enfermedad.

Patógenos facultativos: No causan enfermedades específicas en los hospedadores. Pueden crecer bien *in vitro*

Patógenos obligados: Requieren de condiciones especializadas para su crecimiento y reproducción, puede ser *in vitro* pero en ese caso en medios de cultivos celulares o muy específicos, si bien es posible que solo sean capaces de crecer *in vivo*. Se encuentran asociados a enfermedades en insectos específicos y tienen un limitado rango hospedador.

Vías de entrada al hospedador

Horizontal:

- Por ingestión (*per os*)
- Por contacto
- A través de los espiráculos y/o por el ano
- Venérea
- A través de vectores (por ejemplo parasitoides)

Vertical:

Transmisión de un agente infeccioso o patógeno directamente desde los hospedadores padres a la progenie.

Transovárica:

Modo de transmisión al huevo en el cual el pasaje del microorganismo del hospedador madre al huevo ocurre dentro del ovario.

Transovum:

Se transmite el patógeno a la siguiente generación a través de permanecer en o sobre el huevo.

Infectividad

La infectividad es afectada por diversos factores: estado del hospedador, estadio y edad de las larvas, dosis o concentración del patógeno, secuencia y tiempo de alimentación de cada patógeno, condiciones ambientales (por ejemplo temperatura).

Diagnosis

Proceso por el cual una enfermedad se distingue de otra. Para realizar una diagnosis completa se deben estudiar la etiología, sintomatología, patogénesis, patología y epizootiología. Es una de las ramas más complejas de la Patología de Insectos.

Tipos de diagnosis

- Preliminar
- Diferencial
- Tentativa
- Definitiva

Procedimientos para la diagnosis

- Recolección de datos / hechos
- Análisis de los datos
- Historia de la enfermedad
- Examen físico
- Localidad, sustrato
- Especie de hospedador
- Insectos sanos e infectados
- Datos epizootiológicos
- Análisis morfológicos, histológicos, bioquímicos, moleculares.

Recolección de ejemplares para la diagnosis de enfermedades causadas por entomopatógenos

- Insectos sanos.
- Insectos con leve grado de infección.
- Insectos muertos con signos marcados de infección (con parte del sustrato si es posible).
- El material debe ser conservado “en fresco”, sin fijar, excepto que se conozca el agente causal, en cuyo caso los fijadores varían de acuerdo al tipo de microor-

ganimio (m.o.). Algunos fijadores usados son: formalina 7%, alcohol 70°, glicerol 10%, glutaraldehído.

- El material puede conservarse en la heladera a 4 °C durante un lapso de tiempo no muy largo (unos meses, dependiendo del tipo de patógeno).
- Para protozoos es posible conservar el material en freezer a -20 °C.
- Es muy importante tener datos de si hubo exposición de los insectos hospedadores a aplicaciones de agroquímicos, y conocer cuales fueron.

Postulados de Koch (Robert Koch 1843)

1. Un organismo específico debe ser observado en todos los casos de la enfermedad.
2. Este debe poder ser aislado en cultivo puro (axénico). En caso contrario poder ser mantenido *in vivo*, en insectos en cría, en forma experimental.
3. El organismo en cultivo debe reproducir la enfermedad en un hospedador sano en condiciones experimentales.
4. El mismo organismo debe ser recuperado del animal experimental (hospedador).

Interacciones entre microorganismos

Complementación o sinergismo: es el tipo de interacción donde dos patógenos pueden actuar en forma complementaria sumando efectos, dicho de otro modo, cuando ambos en conjunto incrementan la virulencia o agresividad pudiendo causar la muerte del insecto hospedante en menor tiempo con dosis subletales, que actuando en forma separada.

Interferencia o antagonismo: es cuando un patógeno inhibe al otro al actuar en forma conjunta, causando una interacción negativa y en consecuencia una disminución de la virulencia o la agresividad.

Las interacciones pueden ocurrir además de entre patógenos, con otros organismos (parasitoides, por ejemplo) o bien con productos químicos u orgánicos (insecticidas, fungicidas, inhibidores de crecimiento, etc.).

Bibliografía consultada / recomendada

- Alves, S. B. (1998). Controle Microbiano de Insetos. 2^{da} ed. FEALQ, Piracicaba, Saõ Paulo Brasil.
- Boucias, D. G. & Pendland, J. C. (1998). *Principles of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publ., Boston. 550 pp.
- Lacey, L. (ed.) (2012). *Manual of techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.

- Lecuona, R. E. (ed.) (1996). Microorganismos patógenos empleados en el control de insectos plaga. Mariano Max, Buenos Aires.
- Martignoni, M. E. & Steinhaus, E. A. (1961). Laboratory Exercises in Insect Pathology. 75 pp. Burgess Publ. MN.
- Steinhaus, E. A. & Martignoni, M. E. (1970). An Abridged Glossary of terms used in Invertebrate Pathology. 38 pp. Portland, Oregon, US Forest Service Pacific NW. Forest and range Experiment Station.
- Onstad, D. W., Fuxa, J. R., Humber, R. A., Oestergaard, J., Shapiro-Illan, D. I., Gouli, V. V., Anderson, R. S., Andreadis, T. G. & Lacey, L. A. (2006). An abridged Glossary of terms used in Invertebrate pathology. Society for Invertebrate Pathology. [http:// www.sipweb.org/glossary](http://www.sipweb.org/glossary)
- Tanada, Y & Kaya, H. K. (1993). *Insect Pathology*. 666p. Academic Press, New York, EEUU.
- Weiser, J. (1977). An Atlas of Insect Diseases, 2nd edition. 240 pp. Junk, the Hague.

CAPÍTULO 3

Virus Entomopatógenos

Evangelina Muttis y María Victoria Micieli

Los virus entomopatógenos. Principales Familias: *Baculoviridae*, *Iridoviridae*, *Reoviridae* y *Poxviridae*. Identificación de la infección viral. Técnicas de purificación.

Generalidades

Los virus entomopatógenos pueden dividirse en dos grupos, los que presentan viriones embebidos en una matriz proteica (cuerpos de inclusión o OB: oclusion bodies) y los que no están embebidos (virus no ocluidos). En este capítulo se verán las familias *Baculoviridae*, *Reoviridae* y *Poxviridae* que pertenecen al primer grupo, y los *Iridoviridae* como representantes de una familia de virus no ocluidos. Los OBs son muy importantes porque conservan la capacidad infecciosa fuera del huésped, son insolubles en agua y resistentes a la putrefacción, desintegración por agentes químicos, congelación, desecación y liofilización.

Familia *Baculoviridae*

A estos virus que son exclusivos de artrópodos se los conoce como Nucleopolyhedrovirus (NPVs), excepto los *Betabaculovirus*, que también se los llama Granulovirus (GVs) debido a las características diferentes de sus OBs (Tabla 1). En la Argentina encontramos representantes del género *Alphabaculovirus*, algunos ejemplos son: SfMNPV en *Spodoptera frugiperda*, Ag-MNPV en *Anticarsia gemmatalis*, *Agraulis vanillae*-NPV y de *Deltabaculovirus* en la especie de mosquito *Ochlerotatus crinifer*, pero aún no ha sido identificado como especie de virus.

Géneros	Hospedadores
<i>Alphabaculovirus</i>	Lepidoptera
<i>Betabaculovirus</i>	Lepidoptera
<i>Deltabaculovirus</i>	Diptera
<i>Gammabaculovirus</i>	Hymenoptera

Ciclo viral

Comienza con la ingestión de los cuerpos de inclusión presentes en el alimento. Una vez ingeridos, los OBs se diluyen en el intestino del insecto debido a la alta alcalinidad de sus jugos intestinales (pH 9.5-11). El ciclo de la infección varía según el insecto hospedador, y los tejidos afectados también pueden variar. En un lepidóptero, una vez liberados los viriones, éstos deben atravesar la matriz peritrófica del intestino, y luego la membrana celular, allí comienza la replicación y la diseminación hacia todos los tejidos del cuerpo y la hemolinfa. Algunas partículas virales salen de la célula para infectar nuevas células y tejidos, y son llamados **virus brotantes** (BVs; budded virus), otras permanecen dentro de las células y son incluidas en estructuras proteicas para formar los OBs ocasionando la hipertrofia del núcleo (Fig. 1). Los signos y síntomas de la infección producida por baculovirus se hacen evidentes en estados avanzados de la enfermedad (Tabla 1). Las larvas infectadas migran hacia las partes altas de la planta, donde mueren. El cadáver, de color castaño oscuro (Fig. 2), queda adherido al vegetal y los tejidos se licuan, se produce la ruptura del tegumento de las larvas y la liberación de masas de cuerpos de inclusión que caen sobre partes inferiores de la planta y serán inoculo para futuras infecciones (Caballero *et al.*, 2001). En los dípteros culicidos el proceso tiende a ser bastante diferente ya que el NPV en las larvas de mosquito es específico para tejidos del intestino medio, principalmente epitelio, y los OBs quedan suspendidos en el agua luego de la muerte de las larvas infectadas.

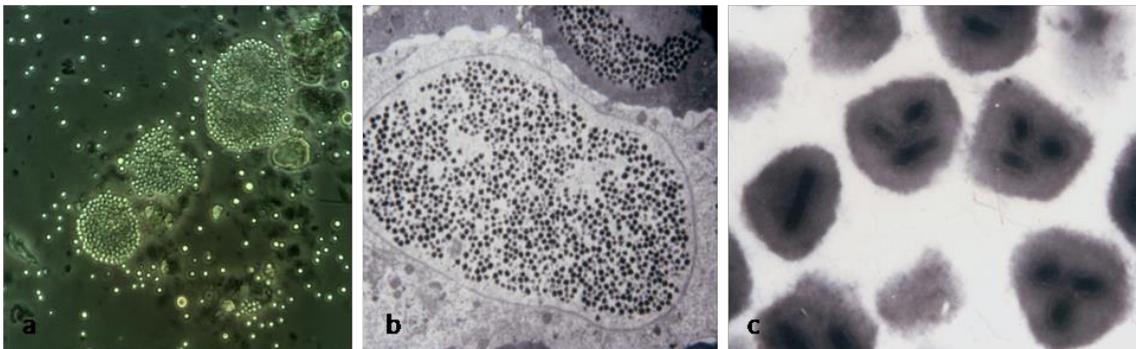


Figura 1. Baculoviridae. Microscopía óptica. Núcleos hipertrofiados en larva de *Agraulis vanillae* (Lepidoptera) infectada (a). Microscopía electrónica de transmisión (MET). Sección ultrafina de una larva infectada de *Ochlerotatus crinifer* (Diptera) se observa un núcleo celular con partículas virales (b). OBs dentro de los cuales se observan los viriones (c).



Figura 2. Larvas de *Rachiplusia nu* infectada con *RanuNPV* (a). Larvas sanas alimentándose de una dieta balanceada para su cría en bioferio (b).

Familia *Iridoviridae*

Los iridovirus afectan tanto a vertebrados como a invertebrados y dentro de éste último grupo, a crustáceos y moluscos. Los invertebrados infectados tienen un signo característico que es la iridiscencia (Fig. 3a), una coloración brillante generalmente turquesa, dada por un efecto óptico que se produce cuando se acumula gran cantidad de partículas virales en el citoplasma celular formando un arreglo paracristalino observable en imágenes de microscopía electrónica (Fig. 3b). Si bien hay numerosos reportes de iridovirus a nivel mundial, en Argentina los únicos hallazgos reportados son de la Región Neotropical, en larvas de tres especies de mosquito *Culex pipiens*, *Cx. dolosus* y *Aedes albifasciatus*. Si bien la infección comienza generalmente en el tejido graso, continúa diseminándose por todo el cuerpo del individuo provocándole la muerte, con un TL50 de 8 días. Algunos individuos no se infectan de forma evidente y transmiten el virus verticalmente (Tabla 1).

Subfamilia <i>Betairidovirinae</i> (exclusiva de artrópodos)	
Géneros*	Hospedadores
<i>Chloriridovirus</i>	Diptera (mosquitos y jejenes)
<i>Iridovirus</i>	Lepidopera Diptera (no mosquitos) Orthoptera

*Con representantes en insectos

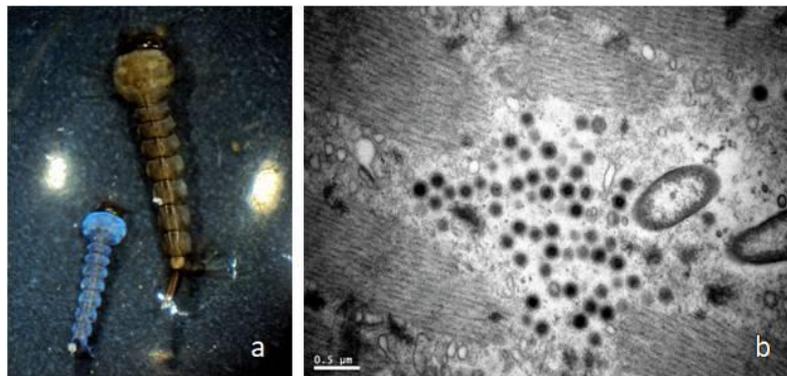


Figura 3. Larvas de *Culex pipiens*, iridisciente (izq.) y con coloración normal (der.) (a). Corte ultrafino de una larva de *Cx. pipiens* infectada en MET, se observan partículas virales icosaedricas (b).

Familia *Reoviridae*

Incluye especies que afectan invertebrados, vertebrados e incluso plantas. El género *Cypovirus* contiene especies aisladas solo de artrópodos, con una gran mayoría de hospedadores lepidópteros y dípteros. Los cuerpos de inclusión formados por poliedrina (Tabla 1), se acumu-

lan en el citoplasma de las células donde se replican. En la mayoría de los casos no produce la muerte, sino una infección crónica, las larvas alcanzan el estado adulto y suelen presentar reducción de la fecundidad y de la supervivencia, pero pueden transmitir el virus verticalmente. El ciclo viral es similar al de los baculovirus, aunque la infección queda restringida a las células de intestino (Tabla 1).

Familia *Poxviridae*

Afectan tanto a vertebrados como invertebrados pero contiene a la subfamilia *Entomopoxvirinae* que es exclusiva de insectos. El ciclo viral es similar al de los otros virus ocluidos. Una vez que ingresan a las células del tubo digestivo, se replican en el citoplasma, próximo a la lámina basal y se dispersan luego hacia el cuerpo graso (principal sitio de replicación) y luego hacia los hemocitos. Los síntomas de infección por EPVs varían entre los hospedadores susceptibles y pueden llevar un tiempo considerable para su manifestación, siendo el *Beta entomopoxvirus* de lepidópteros el que produce mortalidad larvaria en un tiempo más corto, con síntomas a partir de los 10 días post-infección y muerte entre las 3 a 4 semanas. En la Argentina se han hallado en el ortóptero (*Staurorhectus longicornis*).

Subfamilia <i>Entomopoxvirinae</i> (exclusiva de artrópodos)	
Géneros	Hospedadores
<i>Alphaentomopoxvirus</i>	Coleoptera
<i>Betaentomopoxvirus</i>	Lepidptera y Orthóptera
<i>Gammaentomopoxvirus</i>	Diptera

Sintomatología

Se observa el insecto buscando signos y síntomas de la enfermedad, comparando su comportamiento, coloración y textura con un individuo sano.

Para detectar la iridiscencia en la Familia *Iridoviridae*, en especial cuando la infección es incipiente, se coloca el individuo bajo microscopio binocular estereoscópico con un fondo oscuro. Para detectar la presencia de varias familias de virales que afectan el intestino de las larvas de mosquitos, se colocan pequeños grupos de larvas en una cápsula de Petri, se extrae el agua excedente con una pipeta hasta que las larvas queden adheridas en el fondo de la misma. Posteriormente se coloca la cápsula bajo microscopio binocular estereoscópico y se observa por transparencia el intestino de la larva en faz dorsal y ventral invirtiendo la posición de la cápsula.

Se busca detectar la hipertrofia característica de las células del tubo digestivo, dependiendo de la familia viral, ya sea en el núcleo o en el citoplasma.

Tabla 1. Familias de virus y sus características importantes en insectos

	Genoma	Partícula viral	Vías de ingreso	Signos y síntomas
<i>Baculoviridae</i>	dsDNA, 80 a 180 kpb	-Forma de bastón -OBs poliédricos con uno o varios viriones (NPVs) (0.1-2 µm). -OBs ovoesféricos con un solo virión (0.12 × 0.50 µm) (GVs).	-Ingestión	-Cambio de coloración a blanquecino o amarillento, marrón después de muerte -Cambio de hábito -Desintegración de tejidos -Ruptura de la cutícula
<i>Iridoviridae</i>	dsADN, 103-220 kpb	-Viriones con forma icosaédrica (150 y 200 nm)	- Ingestión -Rupturas en cutícula y membrana peritrófica -Vectorizado por nemátodos	-Iridiscencia
<i>Reoviridae</i>	ARN, 1- 4,2 kpb	-Viriones aprox. 60 nm -OBs regulares de forma cuboide (0,1 µm), pocos viriones -OBs irregulares, hasta 3 µm, muchos viriones	-Ingestión (eficiente en presencia de magnesio)	-Blanco opaco en el citoplasma de las células del ciego gástrico y tubo digestivo posterior por acumulación de OBs
<i>Poxviridae</i>	dsADN, 232- 380 kpb)	-Viriones con forma de ladrillo -OBs ovales, 5-20 µm	-Ingestión	-Muy variable entre los hospedadores

Fuente: ICTV Reports (2011 - 2019)

Identificación de la infección viral

Microscopía

Microscopía Óptica

Los cuerpos de inclusión desarrollados por ciertas familias virales, por ejemplo *Baculoviridae*, pueden ser observados con microscopía óptica debido al gran tamaño que presentan dichas estructuras. No pueden ser observadas por este medio las partículas virales aisladas.

- Observación “en fresco” entre porta y cubreobjetos. Se monta hemolinfa o pequeños fragmentos de tejido sospechado de estar afectado sobre una gota de buffer fosfato (PBS). Se observa al microscopio con contraste de fases a 400X.
- Fijación de insectos infectados para estudios histopatológicos bajo el microscopio óptico.

Microscopía electrónica

Es un método directo de confirmación de la infección, ya que se puede ver el tamaño y forma de partículas pequeñas que no pueden ser observadas con microscopía óptica. Además se analiza la zona de replicación dentro de la célula y los tejidos afectados. El primer paso para realizar estudios ultraestructurales bajo el microscopio electrónico de transmisión es la fijación de las muestras. El protocolo para inclusión en resina es muy laborioso y puede ser realizado por los servicios de microscopía electrónica, como por ejemplo el de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP).

Protocolo de fijación: se sumerge el insecto vivo o recién disecado en glutaraldehído 2,5%. Luego de 20 minutos en el fijador, los individuos se cortan en piezas menores para asegurar la infiltración del mismo en los tejidos, y se transfirieren las piezas a glutaraldehído fresco. Las muestras así tratadas pueden conservarse en heladera (4 °C) por un tiempo no muy prolongado o transferirse a una solución de Buffer cacodilato 0,2 M (pH 7,3) durante 3 horas, luego de lo cual se post-fijan en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas, se deshidratan usando concentraciones crecientes de etanol hasta llegar a acetona y finalmente se colocan en resina Epon-Araldita. Se realizan secciones ultrafinas (60 nm), teñidas con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo, para su observación con un Microscopio Electrónico de Transmisión.

Identificación molecular

La identificación molecular a nivel Familia se basa en la detección de segmentos específicos y conservados de ADN mediante la técnica de PCR (protocolo en Capítulo 9). Para los virus de la Familia *Baculoviridae* se intenta amplificar el gen *lef8* correspondiente a un factor de expresión tardía que se asocia a la enzima ARN polimerasa. Para la Familia *Iridoviridae* se utiliza el gen MCP que codifica la proteína mayor de la cápside. La amplificación de los genes *lef8* y *mcp* debe originar un fragmento de ADN de 450 pb y 320 pb, respectivamente.

Técnicas de purificación

Purificar significa separar las partículas virales o cuerpos de inclusión del resto de los tejidos del insecto de manera que quede puro o semi puro. La técnica utilizada variará según el tamaño de la partícula a purificar. Una técnica muy usada en general son los gradientes de sacarosa, en la cual se forma una columna de distintas densidades donde las partículas quedan suspendidas según su tamaño. Además, cuanto menor es el tamaño de la misma, se requerirá un centrifugado a mayor velocidad. Existen distintos protocolos que permiten la extracción de los cuerpos de inclusión OBs de los baculovirus con mayor o menor grado de pureza a partir de los restos del hospedador y a partir de un cultivo celular. En muchos casos no es conveniente puri-

ficar los OBs en forma exhaustiva pues se pierden gran cantidad de estos, en cambio es indispensable cuando se necesite usar como inóculo o bien para la extracción de ADN.

Semipurificación (*Baculoviridae*)

Protocolo

Materiales: Agua bidestilada- Homogeneizador de vidrio-Tela de Muselina

Método:

1. Añadir 1 ml de agua bidestilada al cadáver del insecto
2. Homogenizar vigorosamente la muestra mediante el uso del homogeneizador
3. Filtrar la muestra a través de tela de muselina y descartar los residuos no filtrados
4. Centrifugar a 800 G durante 5 minutos
5. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y eliminar el precipitado

Purificación de virus a partir de insectos infectados

Purificación de OBs- *Baculoviridae*

Para realizar una purificación de los OBs de los baculovirus, los restos de tejidos del insecto hospedador serán tratados con un detergente aniónico: SDS (sodio dodecil sulfato = dodecil sulfato de sodio) para facilitar la lisis tisular y la disgregación de las células favoreciendo la liberación de los OBs desde del interior de las mismas. Los restos celulares son inducidos a la sedimentación mediante el uso de centrifugación a alta velocidad. Luego los OBs serán suspendidos en un pequeño volumen de agua destilada y se filtran mediante un gradiente de sacarosa que permite separar las partículas contaminantes más pequeñas. Se realizarán varios lavados con agua destilada para eliminar todo el resto de sacarosa.

Protocolo

Materiales: SDS 0.1% (p/v) en agua destilada - Homogeneizador de vidrio - Sacarosa 40% (p/v) en agua destilada

Método:

1. Homogeneizar una muestra de larvas en 1 ml de SDS en un homogeneizador de vidrio
2. Centrifugar a 1600 G durante 5 minutos, separar el sobrenadante
3. Suspender el precipitado del paso 1 en 500 µl de SDS
4. Centrifugar a 1600 G durante 5 minutos y separar el sobrenadante
5. Mezclar los sobrenadantes obtenidos en pasos 2 y 4
6. Centrifugar a 5000 G durante 5 minutos
7. Eliminar sobrenadante, volver a suspender el precipitado del paso 4 y juntar

8. Agregar 500 µl de sacarosa por encima de la suspensión del virus del paso anterior
9. Centrifugar a 23000 G (ultracentrífuga) durante 30 minutos
10. Eliminar el sobrenadante y volver a suspender el precipitado en 1000 µl de SDS
11. Centrifugar a 4000 G durante 5 minutos y descartar el sobrenadante (conservar el precipitado).
12. Volver a suspender el precipitado en 500 µl de agua destilada

Semi-purificación y Purificación de Iridovirus (partículas virales de aproximadamente 180 nm)

Protocolo

Materiales: agua destilada, sacarosa 15% (p/v), sacarosa 60% (p/v)

Método:

1. Los individuos infectados se homogenizan en agua destilada con homogeneizador de vidrio
2. La suspensión se filtra con una jeringa con un algodón en su interior para separar los restos de cutícula
3. El filtrado se centrifuga a 1000 G por 15 minutos para descartar restos celulares grandes
4. El sobrenadante se centrifuga a 11000 G por 30 minutos. El precipitado se re suspende en 500 µl de agua destilada
5. La suspensión viral se siembra en un gradiente de sacarosa 15-60% p/v y se centrifuga a 9000 G por 20 minutos
6. Luego de la centrifugación se observa una banda opaca (Fig. 4a), la misma se separa cuidadosamente con micropipeta y se re suspende en 1 ml de agua destilada
7. Se vuelve a centrifugar a 150000 G (ultracentrífuga) por 30 minutos para eliminar la dilución de sacarosa
8. Se elimina el sobrenadante y se re suspende el precipitado en agua destilada.

La semi-purificación se realiza en los cuatro primeros pasos, se debe continuar si se requiere el virus purificado.

Para formar el gradiente de sacarosa entre 15 y 60% se coloca en cada tubo de centrifuga aproximadamente 900 µl de la solución de sacarosa más diluida y por debajo, con mucho cuidado para que no se mezclen las fases, se coloca la misma cantidad de la solución más concentrada. Los tubos se colocan en una gradilla en posición horizontal (Fig. 4b) durante dos horas para que se forme el gradiente, luego se los coloca en posición vertical lentamente.

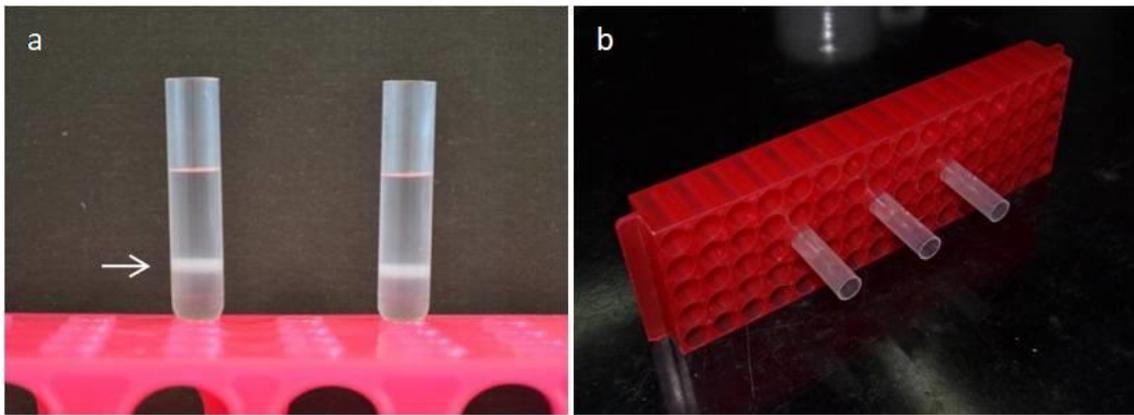


Figura 4. Purificación de iridovirus en gradiente de sacarosa. Se observa la banda viral (flecha blanca) (a). Formación del gradiente (b).

Bibliografía consultada / recomendada

- Adam, J. R. & Bonami, J. R. (1991). Atlas of Invertebrate Viruses, CRC Press, Boston.
- 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.
- Derksen, A. C. G., & Granados, R. R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection. *Virology* 167: 242-250.
- Chinchar, V. G., Hick, P., Ince, I. A., Jancovich, J. K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q., & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae, *Journal of General Virology*, 98, 890–891.
- Detvisitsakun, C., Cain, E. L. & Passarelli, A. L. (2007). The *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus fibroblast growth factor accelerates host mortality. *Virology*, 365, 70-78.
- Engelhard, E. K., Kam-morgan, L. N. W., Washburn, J. O., Volkman, L. E. (1994). The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*. 91: 3224-3227.
- Federici, B. A. (1997). Baculovirus pathogenesis. En: Miller, L.K. (Ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York, pp. 141-166.
- Granados, R. R. & Williams, K. A. (1986). *In vivo* replication of Baculoviruses, En: R. R. Granados & Federici B. A. (ed.), *The biology of baculoviruses* Vol. 1, C.R.C. Press, Boca Raton Florida, pp.89-108.
- Harrison, R. L., Herniou, E. A., Jehle, J. A., Theilmann, D. A., Burand, J. P., Becnel, J. J., Krell, P. J., van Oers, M., Mowery, J. D., Bauchan, G. R. & ICTV Report Consortium. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae, *Journal of General Virology*, 99: 1185–1186.
- Harrison, R. L., Hoover, K. (2012). Chapter 4: Baculoviruses and other occluded insect viruses. In: Vega, F. E. & Kaya, H. K, editors. *Insect Pathology*. 2nd edition. London, England: Academic Press. p. 73-131.

- ICTV Virus Taxonomy Profile: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2011): Poxviridae
- ICTV Virus Taxonomy Profile: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2011): Reoviridae
- Knipe, D. M., Fields, B. N., Howley, P. M. & Griffin, D. E. (2001). Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 3280 pp.
- Martínez, A., Murillo, R., Ruiz de Escudero, I., 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. & Williams, T. Eds. Editorial Phytoma y Universidad Pública de Navarra, España. Capítulo 14: 479-516.
- Muttis, E. (2017). Virus patógenos de Culícidos: diversidad, patología, transmisión y espectro hospedador. (tesis doctoral) Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, La Plata, Argentina.

CAPÍTULO 4

Bacterias entomopatógenas

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

Generalidades sobre bacterias entomopatógenas. Ciclos de infección. Principales familias de bacterias entomopatógenas. Toxinas: modos de acción y síntomas del hospedador. Aislamiento de bacterias entomopatógenas. Identificación morfológica de Bacterias: Protocolos y medios de cultivo para su aislamiento.

Bacterias entomopatógenas. Generalidades

Las bacterias son procariotas unicelulares de tamaño pequeño, que varía entre menos de 1 μm a varios μm , sin núcleo definido ni organelas; pueden ser cocos, bacilos, espiroquetas. Pueden poseer pared celular rígida, o bien no tener pared celular, como en la Clase Mollicutes. Existen Bacterias Gram + y Gram – según la reacción a la tinción de Gram. Pueden presentar endosporas.

Las infecciones causadas por las bacterias se clasifican en:

Toxemia: las bacterias producen toxinas que están confinadas al lumen del intestino.

Bactericemia: las bacterias invaden el hemocele del insecto hospedador y se multiplican allí sin producir toxinas.

Septicemia: las bacterias invaden el hemocele del insecto hospedador y también producen toxinas que matan al mismo.

La vía de entrada al hospedador es principalmente por ingestión (*per os*).

Ciclo generalizado de infección

Una vez que han ingresado al hospedador por la ingesta, las bacterias se multiplican y pueden producir toxinas en el lumen del tubo digestivo, el hospedador pierde el apetito y finalmente muere.

Clasificaciones

Hay varias clasificaciones aplicables a bacterias entomopatógenas, una muy usada las divide en:

Patógenos obligados

Requieren de condiciones especializadas para su crecimiento y reproducción, puede ser *in vitro* en medios de cultivos celulares o muy específico, pero en general es *in vivo* si fuera factible. Se encuentran asociados a enfermedades en determinados insectos. Tienen un limitado rango de hospedadores, circunscripto a especies aisladas, por ejemplo *Bacillus popilliae*.

Formadores de esporas cristalíferas

Crece y esporulan en una amplia variedad de medios de cultivo bacteriológicos clásicos y simples. Tienen un amplio rango de hospedadores. Producen cristales parasporales en esporangios. Poseen un modo de acción común.

Patógenos potenciales

Se multiplican en forma extracelular en el hemocele de insectos y producen septicemias letales. Crece fácilmente en medios artificiales. Poseen un amplio rango de hospedadores. No se encuentran asociados a enfermedades específicas de insectos. Los insectos son resistentes a grandes dosis ingeridas, pero, por invasión del hemocele, unas pocas pueden causar septicemia letal.

Patógenos facultativos

Poseen mecanismos para invadir un tejido susceptible del hospedante o pueden ingresar por medio del daño previo a un tejido, y crece en el lumen del tubo digestivo. Pueden crecer en medios de cultivos artificiales y no causan enfermedades específicas en los hospedadores, por ejemplo *Bacillus thuringiensis*.

Patógenos dudosos

Producen mortalidad por vía de inyección intrahemocélica y en dosis elevadas. Están asociados a la mortalidad cuando son ingeridos y se multiplican en el intestino pero no son capaces de causar la muerte directa del insecto hospedante, ocurren sobre superficies externas.

Otra clasificación las diferencias en:

Bacterias no formadoras de esporas

Familia Pseudomonadaceae

Familia Enterobacteriaceae

Familia Streptococcaceae

Clase Mollicutes

Phytoplasmas

Spiroplasmas

Bacterias formadoras de endosporas

Familia Bacillaceae

Familia Bacillaceae

Es la más representativa como patógenos de insectos. Poseen endosporas, son Gram positivos y con forma bacilar. En ocasiones, junto a la espora se forma un cuerpo proteico al cual se lo denomina cuerpo parasporal o cristal, estos cuerpos cristalinos adyacentes a la espora son tóxicos para distintas especies de insectos. El cristal parasporal es birrefringente, aunque menos que la espora.

Este grupo incluye a los entomopatógenos más importantes para control microbiano de insectos.

***Bacillus thuringiensis*:**

- Gram positivos, aeróbicos, patógenos facultativos
- Actividad catalasa positiva
- Capacidad para hidrolizar almidón, gelatina, glucógeno, N-acetil glucosamina
- Fermentan glucosa, fructosa, trealosa y manosa
- Identificación serológica del antígeno flagelar o antígeno H (De Barjac & Bonnefoi, 1962). Método aceptado para la taxonomía de la especie (De Barjac & Franchon, 1990). Clasificación de *Bacillus thuringiensis* en “serovares”.

Esta clasificación se había basado en la reacción cruzada de antígenos flagelares de *B.t.* contra los anticuerpos producidos a partir de las Cepas tipo, por ejemplo, el serotipo H 14 correspondía a la variedad *israelensis*. Actualmente esta metodología ha perdido su reconocimiento, ya que demostró ser ineficiente para diferenciar cepas con características en desuso ya que son totalmente opuestas (diferentes patotipos, tipo de cristal, patrón de plásmidos) como para poder incorporarlos en un solo serotipo.

Hábitat: suelo, agua, filoplano, telarañas, productos de molienda de cereales, insectos (mucho menos frecuente) también en colonias de cría de insectos. En general las bacterias no pierden propiedades por subcultivos sucesivos *in vitro*.

Los insectos muertos por la toxina ofrecen un ambiente anaeróbico, lo cual no favorece la germinación de esporas ni la multiplicación de las bacterias, razón por la cual raramente se producen epizootias.

Esporulación: las esporas de *B.t.* son elipsoidales, en posición subterminal en el esporangio, son altamente refringentes (Fig 1), resisten condiciones extremas como temperaturas de hasta 70-80 °C por 10-30 minutos y también la desecación, o bien desinfectantes como el etanol 95°. Pierden viabilidad rápidamente con luz UV.

Cristal parasporal: uno o varios (20-30 % del peso seco), son bipiramidales, y generalmente están fuera del *exosporium*.

La esporulación normalmente es inducida por empobrecimiento del medio de cultivo, coincide con la fase de crecimiento exponencial a fase estacionaria- formación de la endospora y del

cristal parasporal. En algunos casos se ha citado que la preservación del cristal dentro de la célula se atribuye a la presencia de “chaperoninas”- proteínas de 20 Kda que se expresan junto con las endotoxinas, aquellas intervendrían estabilizando la estructura del cristal y pueden impedir la acción de las proteasas antes de la cristalización.

Para la esporulación es recomendable agregar sales de Mn, Mg, Ca y Fe al medio de cultivo (con una baja tensión de oxígeno se puede inhibir totalmente la esporulación).

Factores de virulencia: fosfolipasas, proteasas, quitinasas, lecitinasas tipo C. Las lecitinasas son capaces de separar las membranas celulares del hospedador (intestino) y pueden facilitar la penetración y proliferación de las bacterias en el hemocele del hospedador. Las quitinasas destruyen la membrana peritrófica del tubo digestivo medio del hospedador.

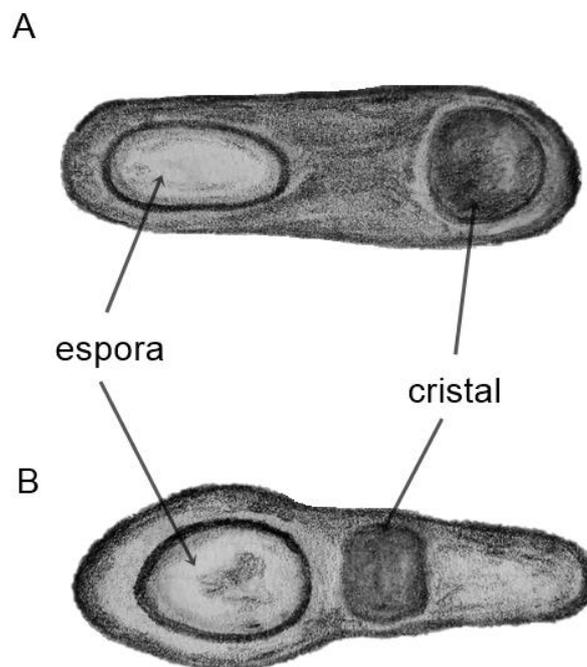


Figura 1. Diferencias morfológicas entre (A) *Bacillus thuringiensis var israelensis* y (B) *Lysinibacillus sphaericus* (ex *Bacillus sphaericus*). En *B.t.i* la endospora terminal es ovalada y la célula bacteriana tiene la forma típica de bastón. En *Ls* la espora es redonda y la célula bacteriana se encuentra deformada o hinchada por la presencia de la espora.

Toxinas

- **Exotoxinas = Beta exotoxinas / thuringiensinas (hemolisinas).** Son termoestables (70 °C, 15 minutos), de bajo peso molecular, se han detectado en varias subespecies de *B.t*. Tienen un amplio espectro hospedador afectando varias especies de lepidópteros, hemípteros, ortópteros, dípteros, himenópteros, isópteros, nematodos y ácaros. La producción de exotoxinas está ligada a la presencia de ciertos plásmidos bacterianos que contienen uno o más genes de exotoxinas. Las exotoxinas son análogas del ATP, inhiben la reacción ARN polimerasa, son

activas contra mamíferos, causando efectos mutagénicos, por lo cual los aislamientos que las poseen no son adecuados para formulación. Los insectos tratados con esta toxina cesan de alimentarse y mueren a los pocos días de la exposición, en ciertos casos expresan efectos teratogénicos, e interrumpe la muda en larvas y pupas. Los adultos sobrevivientes demuestran efectos sobre la fecundidad y longevidad. En vertebrados la exposición a exotoxinas puede causar afectaciones en el hígado, riñones y glándulas adrenales.

- **Cereolisinas** (son similares a la de *B. cereus*)
- **Toxinas VIP.** No forman cristales y son secretadas por las células al medio externo. Se producen en la fase vegetativa del crecimiento. En Lepidoptera: *Spodoptera frugiperda*, *S. exigua*, *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon*, y en Coleoptera: *Diabrotica virgifera*. No se ha descrito con precisión el modo de acción de estas toxinas. Se conoce que se unen a una microvellosidad apical, y que causan la parálisis y lisis de las células intestinales susceptibles (Caballero & Ferré, 2001).
- **Endotoxinas.** Agrupadas entre sí por puentes disulfuro, conformación de las proteínas en látxice y presentan 5 dominios conservadores.
- **δ endotoxinas.** Proteínas Cry y Cyt. Nueva nomenclatura (Schnepf, *et al* 1998).
Página web con clasificación actual y acceso al Gene Bank:

http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/

Proteínas Cry

“Cualquier proteína parasporal de *B. thuringiensis* que muestre efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos, o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry actuales”.

Proteínas Cry: 166 genes Cry en 30 grupos

- Cry 1: aproximadamente 130 Kda, en lepidópteros
- Cry 2: menos de 70 Kda, en lepidópteros y dípteros
- Cry 3: 70-130 Kda, en coleópteros
- Cry 4: 130 y 70 Kda, en dípteros
- Cry 5 y 6: en nematodos

Proteínas Cyt

“Proteínas parasporales de *B.t* que tienen actividad hemolítica (afectan la permeabilidad de la membrana plasmática de células del intestino de insectos), o que muestran similitud con secuencias de proteínas Cyt.”

16 genes Cyt fueron codificados, están en 2 grandes grupos

Las toxinas Cyt no presentan homología a nivel de secuencias primarias ni terciarias con las proteínas Cry. Las Cyt se unen a fosfolípidos, no a receptores específicos

Modo de acción de las endotoxinas

En la Fig 2 se grafica el mecanismo de acción de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cuando la bacteria es ingerida por una larva de *Aedes aegypti*.

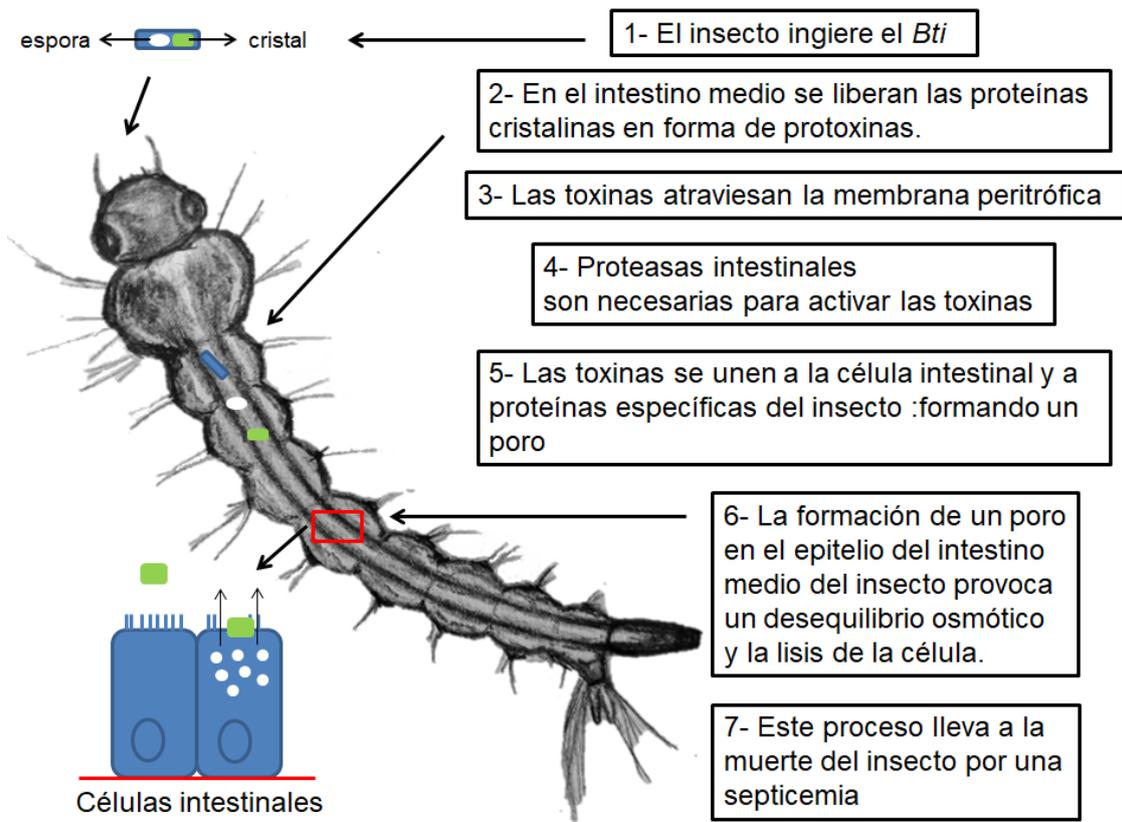


Figura 2. Mecanismo de acción de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en insectos.

Síntomas en el hospedador

Vómitos, diarrea, parálisis general, desaparición de reflejos. La larva muere y aparecen como signos manchas oscuras en el tegumento.

Aislamientos de Bacterias

Pasteurización

Preparar una suspensión de suelo en agua destilada estéril y mezclar 2 minutos en vórtex, pasteurizar 20 minutos a 80 °C o 45 minutos a 65 °C en baño termostatzado, luego realizar 3 diluciones seriadas: 1/10, 1/100, 1/1000 y sembrar de las tres diluciones en placas de Petri esterilizadas (100 mm de diámetro) con agar nutritivo e incubar a 25 °C.

Trabajo Práctico. Identificación morfológica de Bacterias: Protocolos y medios de cultivo para su aislamiento

1. **Observación de cultivos de *B. thuringiensis* var *israelensis* y de *B. sphaericus*** en preparados montados en agua (en fresco) bajo microscopio óptico con contraste de fases. Observar células vegetativas, esporas y cristales.
2. **Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*B.t.i*) en cápsulas de Petri.**
Transferir mediante ansa bacteriológica un cultivo de *B.t.i* a partir de tubo en estría a cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro esterilizadas previamente y conteniendo medio Agar nutritivo, mediante inoculación en zig-zag, bajo cámara de flujo laminar. Invertir las cajas, identificarlas e incubarlas a 30 °C durante 48-72 horas.
3. Comparar los síntomas de una larva de mosquito infectada con *B.t.i* y de una sana, bajo microscopio binocular estereoscópico. Describir los cambios observados.
4. **Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* a partir de larvas infectadas de *Aedes aegypti***
 - Macerar las larvas infectadas en mortero agregando agua destilada estéril.
 - Colocar individualmente las larvas en tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf (1.5 cc) con 1 ml de Tween 0.001% (p/v) en vórtex 1 minuto, luego incubar en baño termostatzado a 65 °C durante 30 minutos (Pasteurización).
 - De esta suspensión tomar 100 µl y sembrar con ansa bacteriológica en medio agar nutritivo en cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro, sellar con parafilm, e incubar a 26 °C.

Protocolo: Aislamiento selectivo de bacterias entomopatógenas

1. Selección y muestreo del hábitat
 - Fuentes principales: Insectos enfermos
 - Suelo y agua
 - Residuos de molienda
 - Registro: Especies hospedantes

Localización y fecha del muestreo

Tipo de hábitat

Mantenimiento: Secadas a temperatura ambiente (suelo)

Muestras conservadas en frío hasta el análisis (-20 °C).

2. Pre-tratamiento de la muestra
 - a- Pasteurización (80 °C 10 a 20 minutos) o Etanol 50-95%, 30 a 60 minutos.
 - b- Germinación selectiva (medios nutritivos, inhibidores como acetato)
3. Crecimiento en medios apropiados e incubación (aeróbica y 30 °C)
4. Examen microscópico y aislamiento
5. Ensayos de patogenicidad
6. Identificación molecular

Medio PEMBAC (específico para *B.t.*)

1. Peptona	1 g
Manitol	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
Azul de bromotimol	0.12 g
Agar	20 g

Llevar a 900 ml con agua destilada, esterilizar en autoclave por 20 minutos y enfriar a 50 °C (mantener por no más de 20 minutos).

2. Suspensión de yema de huevo: 1 huevo de gallina inmerso en etanol 70% por 1 hora. Cascar y retener la yema, bien limpia de clara. Mezclar con 100 ml de agua destilada estéril, asépticamente. Agregar 50 ml de la suspensión al agar a 50 °C.
3. Soluciones de antibióticos (esterilizadas por filtración). [25 mg 2.5ml]
Además agregar al agar:
5 ml solución de polimixina B (10 mg/ml)
1 ml solución de cloranfenicol (1 mg/ml)
50 ml solución de piruvato de sodio 20 % (P/V)

El medio PEMBA viene formulado Oxoid N° CM 617 o Merk N° 5267

La solución de yema de huevo, Oxoid N° SR 47 o Merck N° 3784.

Definiciones

Medio selectivo: permite seleccionar el crecimiento de una especie o grupo determinado (hongos, bacterias entéricas, protozoos.).

Un medio **selectivo** es un medio de cultivo en el que sólo puede crecer un tipo de microorganismo (hongos, bacterias entéricas, protozoos). Un ejemplo de medio selectivo sería usar un medio rico en un antibiótico, como la ampicilina, para permitir únicamente el crecimiento de las bacterias que son resistentes a ése antibiótico.

Medio diferencial: permite identificar una especie con otra, ambas en el mismo medio. Puede ser por su crecimiento, su metabolismo, su respiración, etc. (por ejemplo, medio de McConkey).

Un medio **diferencial** consiste en un medio de cultivo que es capaz de distinguir dos microorganismos por su crecimiento diferencial en el mismo, usando las propiedades metabólicas de ambos en presencia de un determinado nutriente y de un indicador que evidencia, por ejemplo, un pH ácido en su entorno.

Bibliografía consultada / recomendada

Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015 Willey on line
DOI: 10.1002/9781118960608

Boucias, D. G. & Pendland, J. (1998). Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publ., Boston. 550 pp.

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.

De Barjac, H. & Frachon, E. (1990). Classification of *Bacillus thuringiensis* strains *Entomophaga* 35, 233-240.

Caballero, P. & Ferré, J. (2001). Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de Plagas. Phytoma, España en colaboración con la Universidad Pública de Navarra. 318 pp.

Lacey, L. (ed.) (2012). Manual of techniques in Insect Pathology. Academic Press, San Diego.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal cristal proteins *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806).

CAPÍTULO 5

Protozoos entomófilos

Juan José García

Los protozoos entomófilos. Clave simplificada identificar taxones de protozoo entomopatógenos. Características de los principales reinos: Excavata; Amoebozoa; Chromalveolata; Archaeplastida; Ophisthokonta. Métodos para su estudio, identificación, patogenicidad y principales géneros asociados a insectos.

Protozoos entomófilos

Los parásitos y patógenos así denominados corresponden a organismos eucarióticos unicelulares agrupados previamente en el taxón convencional Protozoa. Las clasificaciones modernas no reconocen la existencia del taxón Protozoa, y sus representantes han sido asignados a seis reinos, en los cuales se incluyen todos los organismos eucarióticos presentes sobre el Planeta Tierra (Adl *et al.*, 2005, Walker *et al.*, 2011, Cavalier-Smith, 2010).

Las relaciones simbióticas entre protozoos e insectos son numerosas y variadas y van desde el comensalismo, donde el insecto provee un espacio para que el protozoo cumpla el ciclo de vida, hasta el mutualismo, donde la interrelación entre el insecto y el protozoo es esencial para la supervivencia de cada uno de ellos. Los protozoos pueden invadir casi cualquier tejido y órgano del insecto, aunque los principales grupos se desarrollan en tejidos específicos. Las amebas y flagelados generalmente cumplen el ciclo en el tubo digestivo del insecto. Los Apicomplexa son intracelulares o epicelulares y suelen invadir el tubo digestivo, los tubos de Malpighi y el cuerpo graso e incluso existen formas que invaden el hemocele. Los Microsporidios son parásitos intracelulares con especies que se desarrollan en tejidos específicos y otras que son sistémicas, en general se los ha descrito parasitando todos los tejidos de insectos. Los ciliados citados en insectos generalmente están restringidos al hemocele, luz del tubo digestivo y superficie corporal.

En este capítulo nos referiremos estrictamente a los protozoos parásitos o patógenos de insectos y no consideraremos, por falta de espacio, aquellas relaciones interespecíficas donde los insectos son vectores de protozoos de gran importancia médica-veterinaria y agrícola.

Identificación

A continuación se presenta una clave sencilla para identificar los principales grupos de protozoos entomopatógenos:

1. Con estados móviles que prevalecen en el ciclo biológico, pueden formar quistes
 - 1a. Estados móviles con flagelos.....Trypanosomatidos y Metamonadinos
 - 1b. Estados móviles con cilias.....Ciliados
 - 1c. Estados móviles con pseudopodios citoplasmáticos.....Amebas
 - 1d. Estados móviles por deslizamiento (sin organelas de movimiento conspicuas).....Gregarinas
2. La mayoría o todos los estados no móviles, estados del desarrollo y esporas o quistes localizados dentro y fuera de la célula hospedadora.
 - 2a. La forma más conspicua es un gametoquiste grande ($10\ \mu\text{m}$) de pared gruesa que contiene esporoquistes con esporozoítos.....Gregarinas, Coccidia
 - 2b. Esporas ovoides, piriformes, cilíndricas usualmente entre 2-10 μm con una vacuola posterior en el extremo más ancho de la espora. Poseen un filamento evaginable que puede ser extruído a través del polo opuesto de la espora.....Microsporidia
 - 2c. Esporas similares a 2b pero sin vacuola posterior ni filamento evaginable, pero con una concavidad media longitudinal.....Nephridiophaga
 - 2d. Esporas (5-10 μm) discoidales que contienen tres células y una célula en forma de una larga espiral..... Helicosporidium

Reino Excavata

El Reino Excavata contiene flagelados que en esquemas clasificatorios anteriores estaban dentro del Phylum Sarcomastigophora junto a algunas amebas. Muchos de sus representantes son simbioses de insectos pertenecientes a dos clados, Kinetoplastida y Metamonadina (Walter *et al.*, 2011). Ambos grupos están divididos en varios subgrupos.

Kinetoplastidos-Tripanosomatidos

Son flagelados caracterizados por la presencia de un kinetoplasto, una organela que se colorea como el núcleo y que actualmente se sabe que es parte del mitocondrion, donde se acumula gran cantidad de DNA extranuclear. Los tripanosomátidos tienen un único flagelo y el kinetoplasto situado en la proximidad del cuerpo basal (kinetosoma) del flagelo. Tamaño: 4-15 μm .

Son los flagelados más comunes en insectos, abundantes en Hemiptera y Diptera. Habitan el intestino y los tubos de Malpighi, siendo menos frecuentes en las glándulas salivales.

Métodos: Se observan preparaciones microscópicas en fresco del contenido intestinal, hemolinfa o glándulas salivales en solución salina. Preparados secos coloreados con solución Giemsa 10 % permiten observar el núcleo y el kinetoplasto. Muchos tripanosomátidos pueden ser cultivados, con una multiplicación rápida para alcanzar el número necesario para posteriores estudios moleculares que permitan la identificación específica (Lee & Soldo, 1992; Westenberger *et al.* 2004).

Identificación: Forma de varilla o cuerpo ondulado con movimientos rápidos en las preparaciones frescas, también pueden presentar cuerpos redondeados no móviles. Los preparados coloreados de tripanosomátidos revelan la presencia de un núcleo relativamente grande y un cuerpo denso, el kinetoplasto, localizado cerca del cuerpo basal del flagelo único. Los tripanosomátidos presentan diferentes formas estructurales y los géneros son identificados por las relaciones espaciales entre el kinetoplasto y el núcleo, y la presencia o aparente ausencia del flagelo, así como la posición de la emergencia del flagelo de la célula (Lee *et al.*, 2000). Algunos géneros tienen una única forma, pero usualmente hay varias formas en cada género representando diferentes estados del ciclo biológico.

Patogenicidad: Las especies presentes en el intestino raramente son patogénicas aun- que pueden actuar como organismos estresantes sub-patogénicos, con la excepción que la multiplicación del flagelado sea elevada y bloquee el tubo digestivo. Las especies que llegan a las glándulas salivales a través de la hemolinfa suelen ser más patogénicas para el insecto hospedador.

Principales géneros en insectos:

- *Leptomonas*: predomina el estado promastigota, ocasionalmente presente como quistes, en el tubo digestivo de Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Blattoidea, Lepidoptera, Siphonaptera, Anoplura.
- *Herpetomonas*: las formas dominantes son las promastigotas junto con opistomastigotas, en la luz del tubo digestivo de Diptera.
- *Chritidia*: estados coanomastigotas en la luz del tubo digestivo de insectos de los órdenes Diptera, Hemiptera, Trichoptera, Hymenoptera.
- *Walleceina*: género muy pequeño con flagelados con formas promastigota y coanomastigota. En Hemiptera.
- *Blastochritidia*: estados epimastigotas con formación de quistes. En Diptera, Hemiptera, Siphonaptera, localizados en el lumen del tubo digestivo.
- *Phytomonas*: estados promastigotas. Son patógenos de plantas, viviendo en el sistema vascular de las plantas e insectos que sirven de vectores, generalmente Hemiptera y Diptera.
- *Leishmania*: estados promastigotas en el tubo digestivo de dípteros flebotomíneos adultos y estados amastigotas en macrófagos de vertebrados, causando leishmaniasis humana y animal.
- *Rhynchoidomonas*: preferentemente flagelados tripomastigotas, también presentan estados epimastigotas y amastigotas en los tubos de Malpighi de Diptera.

- *Trypanosoma*: formas tripomastigotas en vertebrados (generalmente sangre) y tripomastigotas, epimastigotas y amastigotas presentes en la luz del tubo digestivo, glándulas salivales y partes del aparato bucal de Diptera, Hemiptera y Siphonaptera, los que sirven de vectores en las tripanosomiasis.

Metamonadina

Son flagelados que han perdido las mitocondrias típicas, carácter común a los miembros del grupo. Las especies viven en ambientes con bajo o nulo contenido de oxígeno, en el tubo digestivo de los insectos hospedadores. Se lo ha citado en el tubo digestivo y tubos de Malpighi de Orthoptera, Diptera, Blattoidea, Isoptera.

Métodos: preparaciones frescas del contenido digestivo, que se dejan secar al aire y se colorean con solución de Giemsa 10% o Hematoxilina férrica de Heidenhain.

Reino Amoebozoa

Los miembros incluidos en este reino se mueven por pseudópodos tubulares; la presencia de pseudópodos es un carácter monofilético. Las especies del grupo pueden formar quistes de resistencia y algunos estados poseer flagelos.

Muchas amebas son de vida libre, otras tantas parasitas en varios invertebrados y vertebrados hospedadores, y unas pocas viven en el intestino y tubos de Malpighi de insectos.

Métodos: Preparaciones frescas de contenido intestinal y extendidos de tubo de Malpighi en solución salina. Extendidos secos al aire coloreados con solución Giemsa 10% o con hematoxilina-eosina.

Identificación: Muy dificultosa, se considera el tipo y formación de pseudópodos, la estructura del núcleo coloreado, la habilidad para la formación de quistes, la existencia de estados con flagelos y el hospedador.

Patogenicidad y representantes: Algunas amebas son comensales y se encuentran en el tubo digestivo, como por ejemplo, *Endamoeba* spp en cucarachas y termitas. Solo tres géneros, *Malamoeba* en Orthoptera, *Malpighamoeba* en abejas (Hymenoptera) y *Malpighiella* en pulgas (Siphonaptera) son conocidos como patógenos de insectos.

Reino Chromalveolata

Constituye un grupo muy amplio de protistas unidos filogenéticamente. Numerosos patógenos de insectos pertenecen al clado Alveolata, un grupo muy grande dentro de los Chromalveo-

lata, caracterizado a nivel ultraestructural por una membrana plasmática con vesículas aplanadas subyacentes denominadas alveólos corticales. Los patógenos de insectos pertenecen a dos subgrupos monofiléticos de Alveolata, Apicomplexa y Ciliophora.

Apicomplexa

Todos los miembros del clado Apicomplexa son parásitos. Se caracterizan porque todas las especies presentan el complejo apical un conjunto de organelas, y estados infectivos, los esporozoítos. El complejo apical consta de un conoide, roptrias y micronemas que ayudan a la penetración a la célula hospedadora. Todos los Apicomplexa son total o parcialmente intracelulares o epicelulares durante al menos parte de su ciclo biológico. Los estados extracelulares se mueven por deslizamiento. Los Apicomplexa son más fácilmente identificados por los ooquistes de resistencia que contiene un número específico de esporozoítos. Los ooquistes son ovals con forma de limón y pared gruesa. Dentro del ooquiste se encuentran los esporozoítos en número determinado. Los esporozoítos son filiformes y uninucleados, constituyen los estados infectivos, cuando un nuevo hospedador ingiere un ooquiste y dentro del tubo digestivo los esporozoítos escapan del ooquiste.

Dentro del clado Apicomplexa, muchas especies parasitan insectos, siendo las gregarinas y los coccidios los más importantes y numerosos. La diferencia entre estos dos grupos es el tamaño de los gamontes (estado sexual) que son grandes en gregarinas y pequeños en coccidios.

Eugregarinas

La mayoría de las gregarinas son parásitos epicelulares con el epimerito anterior (eugregarinas segmentadas) o mucrón (eugregarinas no segmentadas) dentro de la célula hospedadora. La forma del epimerito/ mucrón, el tamaño del cuerpo, la localización dentro del hospedador y la especie hospedadora son caracteres taxonómicos utilizados en la clasificación de las eugregarinas. Los trofozoítos son largos y ovals o filiformes, libres en la luz del tubo digestivo; son los estados más frecuentemente observados. El trofozoíto de varias especies está dividido por un septo transversal (gregarinas septadas) con una parte anterior (protomerito) y una posterior (deuteromerito). Las eugregarinas son observadas en sicigia previo a la formación de gametas, proceso donde se unen dos individuos lateral o terminalmente. Otro estado característico de las eugregarinas es el gametoquiste, un estado grande y esférico formado por dos gregarinas en sicigia que se enquistan y posteriormente se transforman en numerosas gametas. El gametoquiste maduro contiene varios cientos de ooquistes con forma de limón. Los ooquistes son liberados de los gametoquistes por ruptura de la pared o se evacúan a través de tubos evaginables, los esporoductos.

Las Eugregarinas son parásitos de invertebrados y su presencia se presume en todos los órdenes de insectos. La mayoría se las halla presentes en el tubo digestivo aunque algunas se han descrito en los tubos de Malpighi y otras en la cavidad celómica de invertebrados.

Métodos: Los estados se observan bajo el microscopio con contraste de fases en preparaciones frescas de contenido intestinal y fluidos de la cavidad del cuerpo. Las preparaciones se colorean con hematoxilina para visualizar el cuerpo, núcleo y septo del trofozoíto. Los ooquistes se observan con coloración de Giemsa 10% o Hematoxilina férrica de Heildenhain.

Patogenicidad: Las Eugregarinas no poseen esquizogonia durante el ciclo biológico por lo que el número de ejemplares no es excesivo y no se producen, en general, patologías importantes producto de las infecciones por eugregarinas. Hay citas de patogenicidad producida por infecciones de eugregarinas en insectos, por invasión y bloqueo de los túbulos de Malpighi o por alteraciones metabólicas por la infección.

Neogregarinas

Las Neogregarinas son menores que las Eugregarinas, y la mayoría son no segmentadas. El ciclo es similar al de las Eugregarinas pero la gran diferencia es que poseen esquizogonia durante la parte vegetativa del ciclo biológico y otra esquizogonia, durante la gametogonia y la esporogonia.

Las Neogregarinas son parásitos epicelulares e intracelulares en varios órganos y en el hemocele, tubos de Malpighi, intestino y cuerpo graso de insectos.

Métodos: Preparaciones secas al aire coloreadas con solución Giemsa 10% y preparaciones húmedas coloreadas con hematoxilina férrica de Heildenhain permiten identificar los diferentes estados del ciclo biológico de las Neogregarinas.

Patogenicidad y representantes: Las Neogregarinas suelen ser más patogénicas y letales que las Eugregarinas debido a la extensa multiplicación de estados producto de las varias esquizogonias que presentan en el ciclo biológico.

Las principales especies son *Mattesia dispora* y *Farinocystis tribolii*, en el cuerpo graso de insectos que son plaga de granos almacenados.

Coccidia

Los coccidios son todos parásitos intracelulares y se multiplican activamente durante las fases vegetativa y esporogónica del ciclo biológico. La mayoría de las especies descritas son específicas de insectos. El ciclo biológico posee fases esquizogónicas, gametogónicas y esporogónicas. Pueden invadir varios tejidos y órganos del insecto hospedador.

Métodos: Los diferentes estados se pueden reconocer en preparaciones coloreadas con solución Giemsa 10% o Hematoxilina férrica de Heildenhain.

Patogenicidad y representantes: Los géneros más representativos son *Adelina*, *Chagasella*, *Legerella*, *Ithania* y *Rasajeyna*. La forma y el tamaño de los ooquistes, y el número de esporozoítos que contiene son características taxonómicas diagnósticas.

Los datos sobre la patogenicidad de coccidios en insectos son escasos y fragmentarios, siendo más patogénicas las especies con mayor número de divisiones en el ciclo biológico.

Los Haemosporinos son coccidios que utilizan al insecto como vector. La fase sexual del parásito es la que tiene lugar en el insecto, específicamente en el epitelio del intestino medio, para posteriormente migrar a las glándulas salivales y desde estas pasar al hospedador vertebrado. Reducen la longevidad del insecto hospedador. Los haemosporinos son parásitos muy importantes en vertebrados utilizando insectos hematófagos, culícidos, simúlidos, y ceratopogónidos como vectores. *Plasmodium*, *Leuccocytozoon* y *Haemoproteus* son géneros de haemosporinos de importancia sanitaria.

Ciliophora

Organismos propulsados por filas de cilias y que poseen dos tipos de núcleos. Un núcleo grande, macronúcleo, involucrado en funciones vegetativas, y un micronúcleo relacionado con la reproducción sexual. Por debajo de la membrana basal la célula del ciliado tiene alvéolos achatados y rodeados de una membrana, y un complejo sistema de microtúbulos y fibras denominado infraciliatura, un importante carácter taxonómico de los ciliados (Lee *et al.*, 2000).

La mayoría de los ciliados son de vida libre pero hay muchas especies parásitas. Pocos géneros son endoparásitos de insectos. *Lambornella clarki* y *Tetrahymena* spp. Habitan la cavidad del cuerpo de dípteros (Culicidae, Chironomidae y Simuliidae). Los insectos parasitados se identifican por la presencia de ciliados nadando libremente en la hemolinfa del hospedador. Estos ciliados parásitos también tienen estados infectivos de vida libre que buscan activamente a los hospedadores en los ambientes con larvas. *Nyctotherus* y *Tetrahymena* están presentes en el tubo digestivo de cucarachas. Otros géneros y especies de ciliados son epibiontes en larvas y adultos de insectos en ambientes acuáticos.

Métodos: Los núcleos de los ciliados se observan en preparaciones coloreadas con solución Giemsa 10% o Hematoxilina férrica de Heildenhain. La infraestructura es detectada en preparaciones con impregnación argéntica. Varias especies de ciliados entomófilos pueden ser cultivados *in vitro*.

Patogenicidad y representantes: *Lambornella* causa reducción de la longevidad de mosquitos adultos y castración parasitaria en las hembras. *Tetrahymena* spp. son patogénicas cuando el número de ciliados es elevado en la hemolinfa.

Reino Archaeplastida

Algas verdes microscópicas y plantas terrestres están incluidos en este reino. Estos organismos contienen plástidos aunque en las formas parásitas los plástidos están reducidos o ausentes. Se ha descrito solo un representante en este reino que es patógena de insectos, *Helicosporidium* spp., un grupo de algas verdes que han perdido los pigmentos fotosintéticos pero posee genes de un plástido reducido. Este género forma esporas infectivas que consisten en más de una célula. Las esporas discoidales están compuestas de tres células redondeadas centrales rodeadas por tres o cuatro vueltas de otra célula en forma de filamento largo, todas rodeadas por

una valva transparente. Las esporas tienen un tamaño entre 5 a 9 μm de diámetro. Luego de ingerida la espora por el insecto, en el tubo digestivo, la célula enrollada rompe la valva y penetra el epitelio intestinal, pasa al hemocele y a los tejidos del hospedador donde se reproduce y genera nuevas esporas. Las especies de *Helicosporidium*, patógeno de larvas de mosquitos y simúlidos son infectivas para larvas de lepidópteros, sugiriendo un nivel bajo de especificidad. Los sitios comunes de infección son: músculos, cuerpo graso y hemolinfa. Se han registrado infecciones por *Helicosporidium* en Culicidae, Simuliidae, Lepidoptera, Collembola y Coleoptera.

Métodos: *Helicosporidium* spp. se identifican en preparaciones frescas de insectos vivos o muertos bajo el microscopio con contraste de fases. Los núcleos se observan en coloraciones con Giemsa 10%. Las esporas se pueden hacer germinar mediante sucesivos secados y humedecidos alternativos de las preparaciones de tejido infectado. Las esporas se diferencian fácilmente de esporas de otros protistas, particularmente en esporas germinadas.

Patogenicidad: *Helicosporidium* spp. presentan patogenicidad variable, siendo letales para larvas de mosquitos y lepidópteros, aunque estos últimos son hospedadores atípicos.

Reino Opisthokonta

Opisthokonta incluye animales, hongos y algunos protistas relacionados filogenéticamente. Pueden ser flagelados o no flagelados. Los flagelados tienen un flagelo simple y de posición posterior. Dos grupos no flagelados de Opisthokonta, en principio relacionados a Fungi, que han perdido el flagelo, son Nephridiophagidos y Microsporidia.

Nephridiophagidos

Nephridiophaga spp. son protistas no flagelados de relaciones filogenéticas inciertas, pero que se creen relacionados con los hongos Entomophthoromycota (Wylezich *et al.*, 2004). Viven en los tubos de Malpighi de insectos, donde plasmodios esporogónicos multinucleares dan lugar a esporas de pared gruesa quitinosa endogénicamente. Las esporas no tienen filamento interno y tienen un tamaño entre 5 y 8 μm , con una concavidad media longitudinal. Se han descrito en cucarachas, coleópteros, dermápteros e himenópteros (abejas).

Métodos: preparaciones en fresco al microscopio con contraste de fases. Coloración con solución Giemsa 10% para observar los plasmodios y núcleos.

Patogenicidad: no se ha descrito ni observado.

Microsporidia

Los microsporidios son todos parásitos intracelulares obligados. Son protistas no flagelados caracterizados por la producción de esporas con un mecanismo único de infección que permite

al contenido de las esporas ser inyectado en el interior de las células del hospedador a través de un tubo evaginable. Los microsporidios, además de ser patógenos de casi todos los Phyla animales y protistas, son los protozoos con la mayor riqueza de especies patógenas de insectos. Más de 90 géneros de microsporidios tienen como especie tipo a organismos cuyos hospedadores son insectos. Generalmente producen enfermedades crónicas con efectos subletales deletéreos en los hospedadores. La mortalidad excesiva, longevidad reducida y/o fecundidad reducida puede ser un indicador de microsporidiosis en colonias de insectos criados en el laboratorio. Insectos con cutícula traslúcida infectados con microsporidios se detectan porque presentan un color blanco-lechoso y el cuerpo flácido, generalmente por infección del cuerpo graso. Los insectos con cutícula opaca o muy esclerotizada infectados por microsporidios no pueden ser identificados hasta que se realice la disección. Las masas de cuerpo graso blanco-lechoso son, generalmente, células adiposas llenas de esporas de microsporidios.

Las esporas ambientalmente resistentes son los estados más frecuentes hallados en insectos infectados por microsporidios. Las esporas son pequeñas, tamaño entre 2 y 6 μm . La forma es variable, siendo la más común ovoide, pudiendo ser piriformes, esféricas, forma de varilla y raramente reniformes. Las esporas son refringentes al microscopio con contraste de fases; presentan una vacuola posterior en el extremo más ancho, y poseen internamente un filamento (filamento polar) enrollado, a través del cual pasa el germen infectivo (esporoplasma) que penetra en la célula hospedadora cuando la espora germina. Algunos microsporidios forman un solo tipo de espora, otras especies forman varios tipos de esporas en el mismo o en diferentes hospedadores.

Al menos dos tipos de esporas se conocen en varias especies de microsporidios, cada una con funciones bien definidas. Las esporas ambientales son resistentes a las condiciones del medio y son las responsables de la transmisión horizontal entre individuos, y las esporas primarias, que son de pared delgada, son las responsables de transmitir la infección dentro del insecto hospedador, entre tejidos y órganos. Los microsporidios presentan ciclos complejos comenzando con el ingreso del esporoplasma en la célula hospedadora, hay una o varias divisiones merogónicas con formación de estados con núcleo simple o doble (diplocarion), en algunos hay formación de plasmodios multinucleados, todos estos estados con membranas lisas y delgadas. Los merontes dentro de la célula comienzan la esporogonia con formación de esporontes, pueden o no existir procesos meióticos para terminar en la formación de las esporas, con sus complejas estructuras internas. Las esporas son el único estado del ciclo biológico de los microsporidios que puede estar fuera de una célula, inclusive tolerando condiciones extremas de temperatura y deshidratación.

Los Microsporidios son parásitos de otros animales y de protistas, pero son especialmente comunes en artrópodos. Los tejidos más afectados son el epitelio intestinal, cuerpo graso, glándulas de la seda y salivares, túbulos de Malpighi y músculos, aunque las infecciones sistémicas son también comunes.

Métodos: Los extendidos de tejidos infectados entre porta y cubreobjetos observados en fresco al microscopio con contraste de fases o fijados con metanol y coloreados con solución Giemsa 10% son las primeras técnicas a realizar ante insectos sospechosos de microsporidiosis. Preparados coloreados con hematoxilina férrica de Heidenhain son recomendados para

observar estructuras membranosas y esporas. La lacto aceto-orceína es muy recomendada para observar núcleos y cromosomas. Los estudios ultraestructurales son necesarios para describir las esporas y estados preesporales.

La identificación de microsporidios requiere el conocimiento del ciclo biológico y de las características ultraestructurales de los diferentes estados. La clasificación de los microsporidios está basada en varios caracteres: el número de núcleos y su configuración durante la merogonia, la esporogonia y las esporas. El núcleo puede ser simple, diplocariótico o plasmodios multinucleados. Esporos mono o binucleados.

Los esporos pueden estar en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora, o dentro de una membrana de variado origen y con número variado de esporas en su interior, la denominada vesícula esporofórica es formada por el microsporidio, y la vacuola parasitofórica aparentemente es originada por la célula hospedadora.

Los microsporidios suelen tener una elevada especificidad por el hospedador. El ciclo biológico de los más sencillos se completa en un solo hospedador, mientras que los más complejos presentan formación de distintos tipos de esporas e incluso presencia de un hospedador intermediario.

Son necesarios los datos moleculares para la correcta identificación de especies y para determinar relaciones filogenéticas. (Weiss & Vossbrinck, 1999).

Patogenicidad: Los microsporidios son parásitos muy bien adaptados a sus hospedadores y raramente producen la muerte rápida del hospedador, de tal manera de tener tiempo suficiente para producir enormes cantidades de esporas. Muchos microsporidios se transmiten oralmente a los hospedadores, pero también existe la transmisión vertical mediante la infección de los órganos reproductores del hospedador (transmisión transovárica) o por contaminación de los huevos (transmisión *transovum*). Los efectos subletales como reducción de la longevidad y/o fecundidad son efectos frecuentemente mencionados en muchas especies de microsporidios.

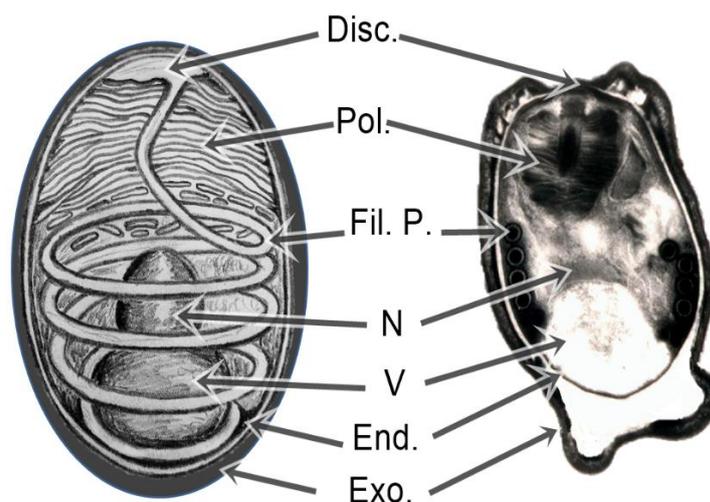


Figura 1. Esquema de un espora típico de microsporidio (izquierda). Foto al microscopio electrónico de transmisión, de un espora de microsporidio (derecha). Disc.: disco de anclaje; Pol.: polaroplasto; Fil.P.: filamento polar; N: núcleo; V: vacuola; End.: endoespora; Exo.: exoespora.

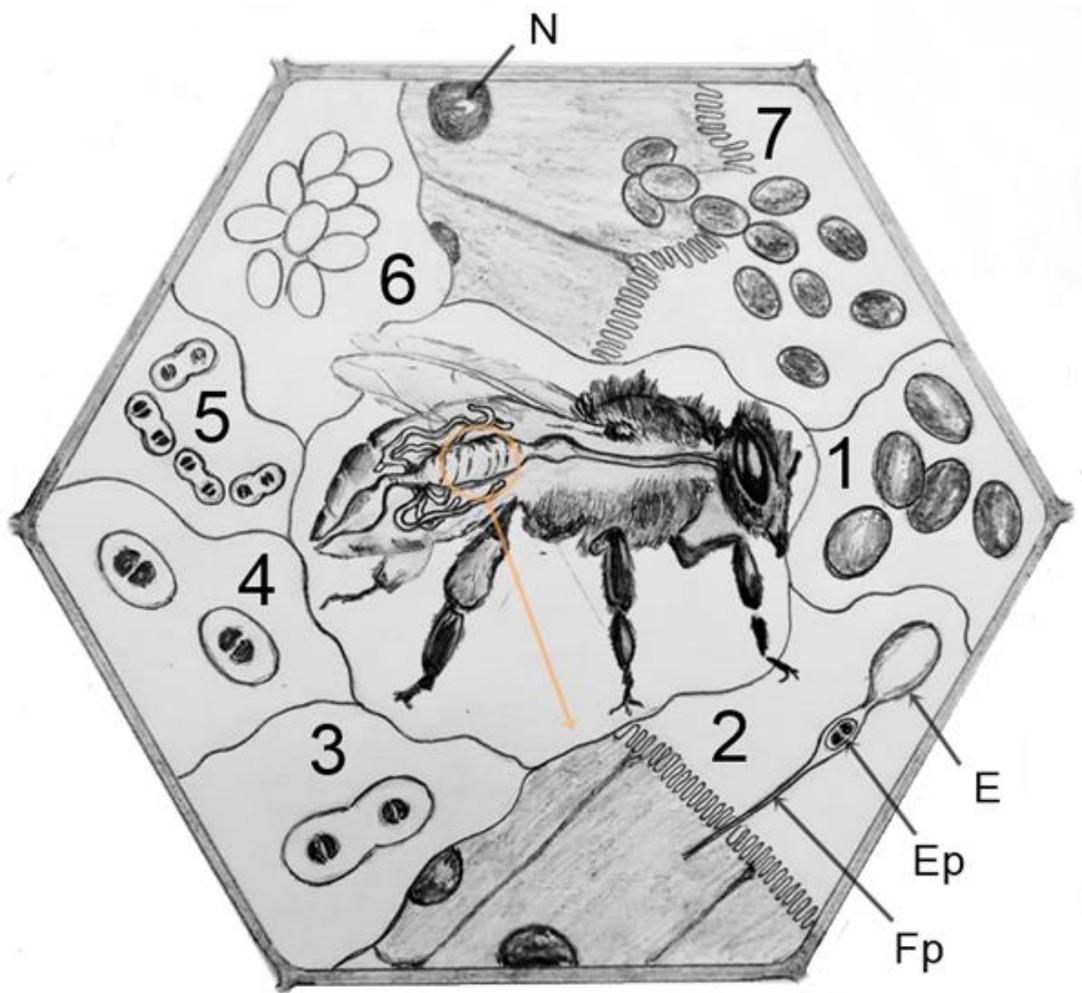


Figura 2. Ciclo de vida de *Nosema apis* (Microsporidio) causante de Nosemosis en abejas.

1. Esporo infeccioso que contiene un esporoplasma binucleado. Las abejas, *Apis mellifera*, se infectan al tragar los esporos presentes en las heces de individuos enfermos. 2. En el intestino medio el filamento polar tubular se evierte y penetra en la célula intestinal. El esporoplasma migra a través del filamento tubular hacia el interior de la célula intestinal del huésped. 3-5. El esporoplasma se divide asexualmente generando células cuadrinucleadas, dentro de la célula del huésped, siendo esta la fase merogónica. 6. La formación de esporos o enquistación se inicia con la formación de dos núcleos apareados (diplocarion), fase esporogónica. 7. Finalmente la célula del huésped se rompe liberando las esporas maduras infecciosas, que pueden salir con las heces o infectar células vecinas. E: espora; Fp: filamento polar; Ep: esporoplasma; N: núcleo de la célula del hospedador.

Bibliografía consultada / recomendada

- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. & Taylor M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5):399-451. J.
- Cavalier-Smith, T. (2010). Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol. Lett*, 6, 342-345.

- Lee, J. J. & Soldo, S. T. (1992). *Protocols in Protozoology*. Lawrence, K. S. Society of protozoologists at Allen Press pp.240.
- Lee, J. J., Leedale, G. F. & Bradbury, P. (2000). *An Illustrated Guide to the Protozoa*, Lawrence, K. S: Society of Protozoologists. Pp. 1432.
- Walker, G., Dorrell, R. G., Schlacht, A., & Dacks, J. B. (2011). Eukariotic systematics: A user's guide for cell biologists and parasitologists. *Parasitology* 138 (13): 1638-1663.
- Weiss, L. M & Vossbrinck, C. R. (1999). Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In M. Wittner, y L. M. Weiss (Eds). *The Microsporidia and Microsporidiosis*, pp 129-171. Washington, DC: ASM Press.
- Westenberger, S. J., Sturm, N. R., Yanega, D., Podlipaev, S. A., Zeledon, R., Campbell, D. A., & Maslov, D. A. (2004). Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: Genotyping of parasites from Heteroptera using the apliced leader RNA gene. *Parasitology* 129, 537-547.
- Wylezich, C., Radek, R., & Schlegel, M. (2004). Phylogenetic analysis of the 18S rRNA identifies the parasitic Protist *Nephridiophaga blattellae* (Nephridiophagidae) as a representative of the Zygomycota (Fungi). *Denisia* 13, 435-442.

CAPÍTULO 6

Hongos patógenos de insectos

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

Introducción a los hongos patógenos de insectos. Vías de entrada. Ciclo generalizado de infección. Unidades infectivas. Identificación Taxonómica: ejemplos. Signos y síntomas de la infección. Protocolos para el aislamiento de hongos entomopatógenos. Protocolo para la estimación de la viabilidad de las esporas.

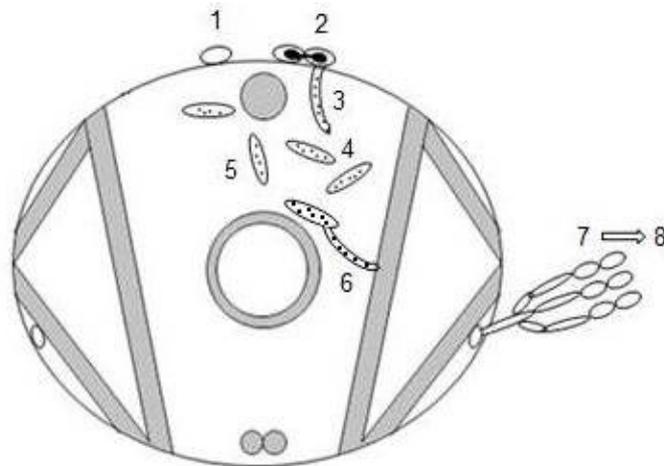
Introducción a los hongos como patógenos de insectos

Los hongos patógenos de insectos si bien se asocian a estos, también infectan a otros artrópodos tales como ácaros y arañas. Cuando son patogénicos pueden causar la muerte del hospedador (Humber, 2016). Esta temática ha sido ampliada y profundizada previamente en el libro específico de Hongos patógenos de insectos (López Lastra & Lecuona, 2019)

Vías de entrada

- Por contacto a través del tegumento o cutícula del insecto hospedador
- *Per os* (ingesta), en menor proporción
- En pocos casos por transmisión vertical a la descendencia

Ciclo generalizado de infección



1. Adhesión de la espora o conidio.
2. Germinación de la espora o conidio / formación de apresorios.
3. Penetración de las hifas.
4. Multiplicación del hongo en el hemocele del insecto.
5. Liberación de toxinas (en algunos casos).
6. Invasión de los tejidos, lisis y muerte del insecto.
7. Esporulación externa del hongo a través de la cutícula del insecto hospedante.
8. Infección a otros insectos sanos a través del inóculo fúngico (esporas, conidios, etc.)

Unidades infectivas (inóculo)

- Conidios, ascosporas, basidiosporas.
- Zoosporas, esporangiosporas.
- Conidios secundarios (en Entomophthorales).

Nota aclaratoria: las hifas vegetativas o micelio no son infectivas

ID Taxonómica

Para la identificación taxonómica se usan caracteres morfológicos, fisiológicos y moleculares, algunos de los libros básicos de consulta como atlas y claves son referenciados (Samson *et al.*, 1988; Humber, 1997, 2016; Tzean, 1997)

Los caracteres diagnósticos para la identificación de los hongos entomopatógenos son variables de acuerdo al grupo taxonómico al cual pertenezcan. Se usan las formas y medidas de los distintos tipos de esporas o conidios, así como de otras estructuras reproductivas tales como esporas de resistencia. Se deben considerar los datos obtenidos a partir del material vivo (hospedador) y también, si es posible, aquellos obtenidos a partir del cultivo *in vitro*.

Para realizar una correcta ID taxonómica es necesario complementar los datos morfológicos (fenotípicos) con los moleculares (genotípicos). Para tal fin y dependiendo de cada especie fúngica se recomienda amplificar, a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), más de un gen. Entre ellos podemos citar las subunidades menor y mayor del ADNr

(18S o SSU y 28S o LSU, respectivamente), los espacios transcriptos internos (ITS), el factor de elongación de la transcripción 1 (TEF-1) y la α -tubulina (Driver *et al.*, 2000; Rehner & Buckley, 2005; Tsui *et al.*, 2006; Rehner *et al.*, 2011).

Ejemplos de clasificación de hongos entomopatógenos

Reino Straminipila

Peronosporomycetes

Orden Lagenidiales. Ejemplos: *Lagenidium*, *Crypticola*

Orden Saprolegniales. Ejemplos: *Saprolegnia*, *Leptolegnia*

Reino Fungi

Phyllum Chytridiomycota

Clase Blastocladiomycota

Orden Blastocladales. Ejemplos: *Coelomomyces*, *Myiophagus*, *Coelomycidium*

Phyllum Entomophthoromycota

Orden Entomophthorales. Ejemplos: *Basidiobolus*, *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Eryinia*, *Eryniopsis*, *Furia*, *Massospora*, *Meristacrum*, *Neozygites*, *Pandora*, *Tarichium*, *Strongwellsea*, *Thaxterosporium*, *Zoophthora*

Phyllum Glomeromycota

Orden Mucorales. Ejemplo: *Sporodiniella*

Orden Harpellales

Phyllum Ascomycota

Clase Sordariomycetes (=Pyrenomycetes)

Orden Clavicipitales

Clavicipitaceae/ Cordycipitaceae/ Ophicordycipitaceae

Cordyceps, *Ophyocordyceps*, *Torrubiella*, *Hypocrella*

Orden Hypocreales

Clase Loculascmycetes

Orden Myriangiales. Ejemplo: *Myriangium*

Clase Laboulbeniomycetes

Orden Laboulbeniales. Ejemplo: *Laboulbenia*

Phyllum Basidiomycota

Clase Teliomycetes

Orden Septobasidiales. Ejemplos: *Septobasidium*, *Urediniella*

Signos y síntomas de una infección fúngica

Signos: Una de sus definiciones más comunes expone que se tratan de las manifestaciones de una enfermedad evidentes para un observador diferente al que la posee. En el caso de los

insectos estas manifestaciones pueden ser la melanización y endurecimiento del tegumento, la momificación y el enrojecimiento (cuando hay producción de toxinas por parte del hongo patógeno. Ejemplo: bovericina o basianolida).

Síntomas: A diferencia de los signos, los síntomas son la manifestación de una enfermedad que solo es percibida por el individuo que la padece. Estos pueden ser el fototropismo positivo, cese de alimentación, a veces desorientación cuando se invade el tejido nervioso en el caso de algunas especies de *Cordyceps*.

Protocolos para el aislamiento de hongos entomopatógenos

Aislamiento a partir de muestras de suelo de distintos ambientes

- **Análisis de tierra *in vitro*. Uso de medios de cultivo selectivos.** Pesar 0.5 gr de tierra procedente de distintos lugares y agregar 2 ml de agua destilada. Homogeneizar en vórtex y preparar 3 diluciones seriadas (1/10; 1/100; 1/1000). Tomar 100 µl de la última dilución y sembrarlo en medio cristal violeta, rotular e incubar a temperatura de 25 °C durante una semana a diez días.
- **Análisis de tierra *in vivo*. Uso de insectos cebo o trampa.** Colocar tierra previamente tamizada y pesada en un recipiente plástico, humedecerla con agua destilada y colocar en esta los insectos blanco seleccionados. Sellar el recipiente y ponerlo a incubar durante una semana a diez días a 25 °C.

Aislamiento directo a partir de un hospedador infectado

El aislamiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a partir de insectos infectados se puede realizar mediante la adhesión de las esporas a una aguja o escarbadientes esterilizados, bajo microscopio estereoscópico. Las esporas se inoculan en medio de cultivo selectivo SDYA ¼ conteniendo antibiótico (gentamicina – cloranfenicol o penicilina – estreptomycin). Las placas se rotulan y se sellan con parafilm, o en su defecto con film adherente, e incuban a 25 °C por 7 días.

Entomophthoromycota

Método descendente de descarga de conidios (Adaptado de Papierok & Hajek, 1997)

Los insectos hospedantes infectados deben ser esterilizados superficialmente mediante sucesivos baños en alcohol 70 %, agua destilada esterilizada, hipoclorito de sodio 0,5% y finalmente en baños sucesivos en agua destilada estéril. Luego deben ser adheridos a la tapa de

una cápsula de Petri de 35 mm de diámetro con vaselina sólida o cinta adhesiva doble faz. Las cápsulas utilizadas contendrán medio SEMA (SDYA + yema de huevo + leche) o SDYA más antibiótico (penicilina – estreptomocina), 1 ml de antibiótico cada 100 ml de medio. Los conidios se descargarán sobre el medio de cultivo en forma “activa”, a esto se lo denomina “lluvia de conidios”. A las 12 horas posteriores se extraerán los insectos y se cambiará la tapa de la caja de Petri por una nueva tapa estéril. Se observará si hubo descarga de conidios en el medio y si existe crecimiento fúngico sin contaminantes. Los cultivos se incubarán a 20 °C en oscuridad por 6-7 días, luego se observarán los aislamientos obtenidos. Si los cultivos son axénicos (puros, libres de contaminación) serán transferidos a medio SDYA en tubos en estría y luego de su crecimiento se conservarán en heladera a 4 °C.

Método ascendente de descarga de conidios (Adaptado de Papierok & Hajek, 1997)

Los insectos hospedantes infectados deben ser esterilizados superficialmente de la misma manera descrita en el método anterior. Posteriormente se deben ubicar los insectos infectados en la base de una cápsula de Petri de 35 mm de diámetro sobre papel de filtro esterilizado y humedecido con agua destilada estéril. Se coloca un portaobjetos esterilizado sobre la cápsula de Petri donde se recolectan los conidios descargados y se incuban a 20 °C en oscuridad. A las 12 horas posteriores se recogen los conidios con un ansa bacteriológica y se inoculan en una cápsula de Petri (60 mm) conteniendo medio de cultivo SDA con el agregado de 2% de extracto de levadura. Otro medio que se utiliza también es SEMA (SDA + 2% de extracto de levadura, suplementado con yema de huevo y leche). Para ambos casos se debe agregar al aislamiento inicial antibióticos, aconsejándose: estreptomocina - penicilina, o gentamicina - cloranfenicol.

Protocolo para la estimación de la viabilidad de esporas

(Adaptado de Lane *et al.*, 1988)

La viabilidad (germinación de los conidios) se obtendrá registrando el porcentaje de conidios germinados a las 24 horas de iniciado el tratamiento.

- Bajo cámara de flujo laminar preparar 1 ml de una suspensión de 1×10^6 conidios/mililitro en Tween 80 al 0.01% v/v (*)
- Colocar 1 ml de medio de cultivo SDYA enriquecido con 1% de extracto de levadura sobre un portaobjetos y esparcirlo uniformemente formando una película delgada utilizando un ansa de Drigalsky. Dejar solidificar.
- Colocar 1 μ l de la suspensión sobre el medio solidificado.
- Colocar el portaobjetos en una cápsula de Petri (100 mm de diámetro) conteniendo papel de filtro (todo previamente esterilizado durante 20 minutos en autoclave a 120 °C y 1 atmósfera de presión).
- Incubar por 24 horas a 25 °C

- Realizar el recuento de las esporas o conidios germinados bajo el microscopio óptico. Contar tres veces 200 conidios y obtener un promedio para cada una de las tres réplicas (considerar conidios germinados y no germinados).

(*) Aclaración: en todo el documento cuando se refiere a Tween, este es un ejemplo, pero bien pueden ser utilizados otros tensioactivos para realizar las suspensiones de conidios.

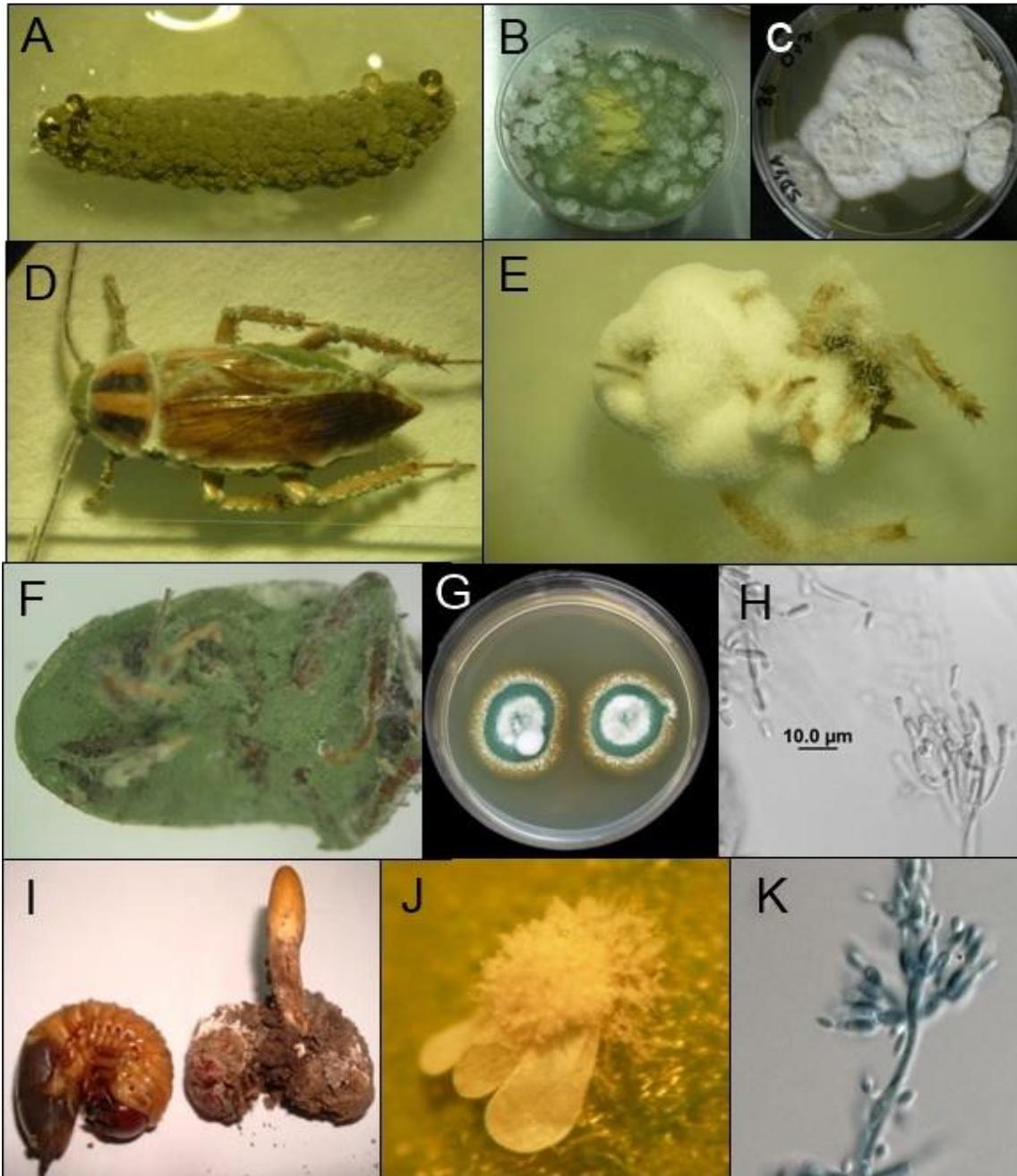


Figura 1. A. gusano de la harina (*Tenebrio molitor*: Coleoptera) infectado con *Metarhizium* sp.; B. cultivo de *Metarhizium anisopliae*; C. cultivo de *Beauveria bassiana*; D. cucaracha alemana (*Blattella germanica*: Blattodea) infectada con *Metarhizium anisopliae*; E. cucaracha alemana (*Blattella germanica*: Blattodea) infectada con *Beauveria bassiana*; F. cucaracha silvestre (*Epilampra* sp.: Blattodea) infectada con *Metarhizium argentinense*; G. cultivo de *M. argentinense*; H. microcultivo de *M. argentinense* donde podemos observar conidióforos, células conidiógenas y conidios; I. Larva de gusano blanco (*Diloboderus abderus*: Coleoptera) infectada con *Cordyceps* sp.; J. Mosca blanca infectada con *Isaria fumosorosea*; K. microcultivo de *Isaria fumosorosea* donde podemos observar conidióforos, células conidiógenas y conidios.

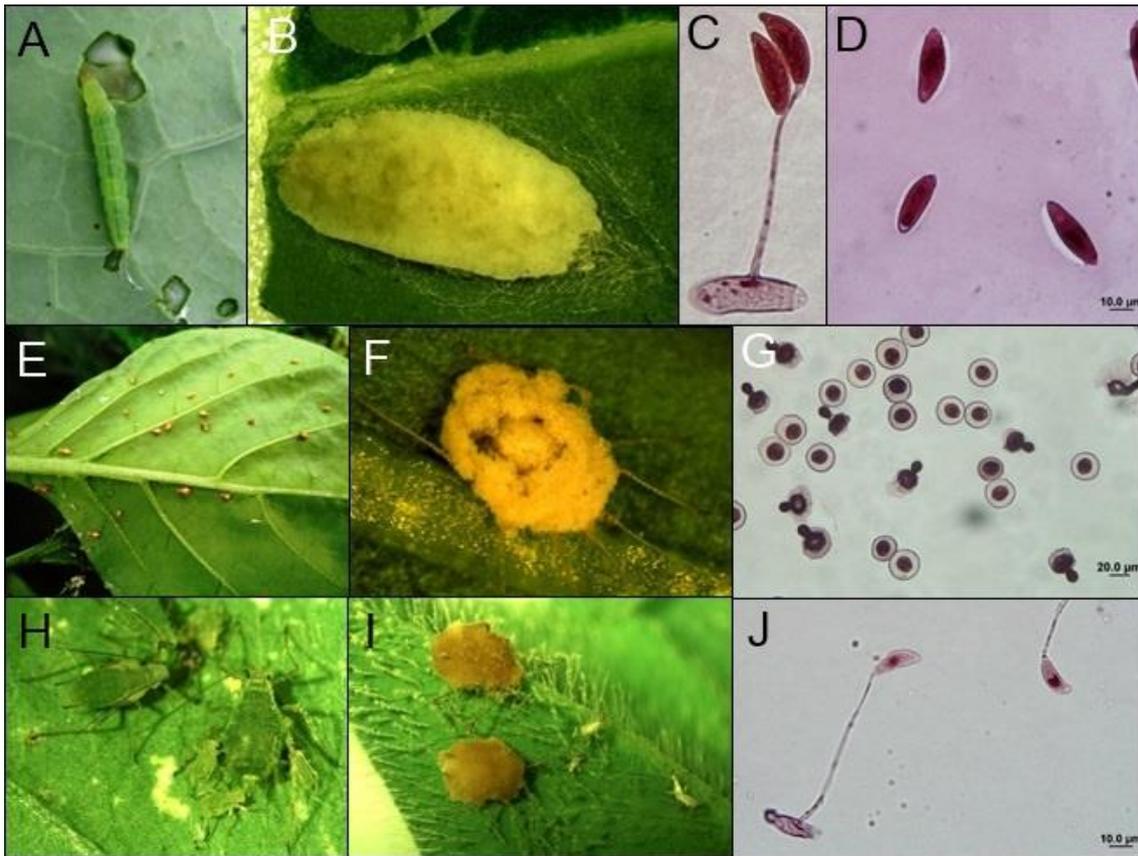


Figura 2. **A.** Larva sana de polilla del repollo (*Plutella xylostella*: Lepidoptera); **B.** Pupa de la polilla del repollo infectada con *Zoophthora radicans* (Entomophthorales); **C.** Capiliconidio de *Z. radicans*; **D.** Conidios de *Z. radicans*; **E.** *Entomophthora planchoniana* infectando pulgón verde (*Myzus persicae*: Hemiptera); **F.** Detalle de pulgón verde infectado con *E. planchoniana*; **G.** Conidios primarios y secundarios de *E. planchoniana*; **H.** pulgón del guisante sano (*Acyrtosiphon pisum*: Hemiptera); **I.** pulgón del guisante infectado con *Zoophthora radicans*; **J.** Capiliconidios de *Z. radicans*.

Bibliografía consultada / recomendada

- Driver, F., Milner, R. J. & Trueman, J. W. H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104, 134-150.
- Humber, R. A. (1997). Fungi: Identification. In: L.A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. (pp. 153-185). Academic Press, London, UK.
- Humber, R. A. (2009). Entomogenous fungi. In: M. Schaetter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. (pp. 443-456). Academic Press, San Diego, EEUU.
- Humber, R. A. (2016). Entomophthoromycota: A new overview of some of the oldest terrestrial fungi. In: D.W. Li (Ed.), *Biology of Mycofungi. Fungal Biology* (pp. 127-145). Springer International, Cham.New York, EEUU.
- Lacey, L. (2012). *Manual of techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, EEUU
- Lane, B. S., Humphreys, A. M., Thompson, K. & Trinci, A. P. J. (1988). ATP content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as a criterion of spore viability. *Transaction of the British Mycological Society* 90, 109-148.

- Lecuona, R. E. (1996). Microorganismos patógenos empleados en el control de insectos plaga. Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina. 338 pp.
- López Lastra, C. C. & Lecuona, R. E. (2019). Micopatología de artrópodos. INTA, Buenos Aires, Argentina. 262 pp.
- Papierok, B. & Hajek, A. (1997). Fungi, Entomophorales. *In*: L. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology*. (pp.187-212). Academic. Press, San Diego, EEUU.
- Rehner, S. A. & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97, 84-98.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-Ard, J. J., Devotto, L. & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103, 1055-1073.
- Samson, R. A., Evans, H. C. & Latgé, J. P. (1988). Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer. Verlag, Berlin.
- Tanada, Y. & Kaya, H. K. (1993). Insect Pathology. Academic Press, New York, EEUU. 666 pp.
- Tsui, C. K., Sivichai, S. & Berbee, M. L. (2006). Molecular systematics of *Helicoma*, *Helicomyces* and *Helicosporium* and their teleomorphs inferred from r DNA sequences. *Mycologia* 98, 94-104.
- Tzean, S. S., Hsieh, L. S. & Wu, J. (1997). Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan. Ed. by Council of Agriculture Executive Yuan.

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; Silicagel; 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 simbioses 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.fcnym.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.

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.

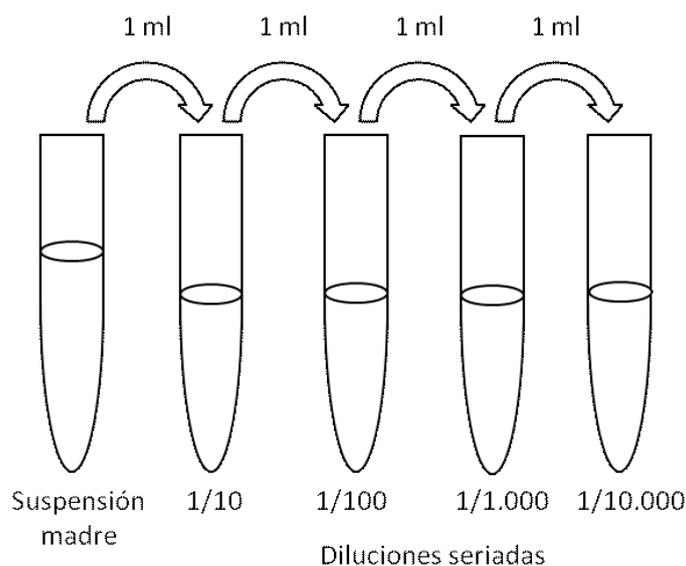
Bioensayos con hongos entomopatógenos

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.

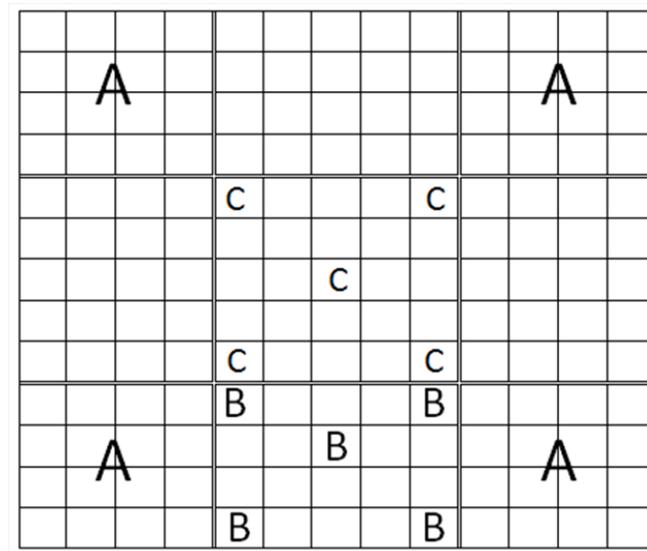
Una vez seleccionado el vehiculizante adecuado, se debe proceder a extraer o cosechar los conidios a partir del cultivo fúngico. Si el cultivo se encuentra crecido en medios de cultivo artificiales en placas de Petri, los conidios podrán cosecharse raspando con una espátula toda la superficie de la colonia 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 portaobjeto).
- 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 ultrafinas 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:

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

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.

CAPÍTULO 9

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

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

Introducción. Recolección de muestras del patógeno. Extracción de ADN del patógeno. Determinación de la calidad y concentración del ADN. Amplificación de genes específicos mediante la técnica de PCR. Electroforesis en geles de agarosa. Secuenciación, comparación de secuencias génicas con bases de datos e identificación taxonómica a partir de la construcción de árboles filogenéticos.

Introducción

La identificación de los patógenos de insectos generalmente es realizada por descripción de los caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos. Sin embargo, las características morfológicas en general permiten identificar los patógenos a nivel de género y no a nivel de especie. Es por esto que las técnicas de biología molecular surgieron como una excelente herramienta para identificar los patógenos de insectos a nivel de especies y, en algunos casos, diferenciar aislamientos o cepas dentro de la misma especie.

Actualmente existe una amplia gama de técnicas moleculares que consisten en el análisis de las secuencias de nucleótidos del ADN o aminoácidos de las proteínas o isoenzimas. Entre ellas se destaca la técnica de “reacción en cadena de la polimerasa” (Polymerase Chain Reaction, PCR) que permite, a través de marcadores moleculares, estudiar la variación genética entre individuos, poblaciones y especies. Un marcador molecular es un segmento de ADN con o sin función conocida que proporciona información sobre la variación alélica y permite distinguir individuos (Schlötterer, 2004). El éxito de las técnicas de amplificación del ADN dependen de varios factores que están relacionados a la muestra, al patógeno, al proceso de extracción y purificación de DNA y a los componentes de la reacción de PCR, lo cual afecta su sensibilidad y reproducibilidad (Velázquez *et al.*, 2014).

Este capítulo pretende ser una introducción a los protocolos más utilizados para la identificación y caracterización molecular de los patógenos de insectos, detallando las principales etapas de cada proceso (Figura 1).



Figura 1. Descripción de los pasos para la identificación y caracterización de patógenos de insectos

Recolección de muestras del patógeno

Algunos patógenos son factibles de aislar y cultivar *in vitro*, como la mayoría de las bacterias y los hongos, pero otros grupos, como los virus, deben mantenerse en cultivos *in vivo*, lo que ocasiona un mayor costo de mantenimiento. En otros casos puede haber escaso material disponible para realizar la identificación.

Para comenzar el proceso de identificación molecular es necesario obtener una muestra, la cual dependerá del tipo de patógeno con el que estemos trabajando, porque las muestras pueden ser recolectadas por ejemplo a partir de insectos infectados, muestras de suelo, o cultivos puros. La recolección de la muestra del microorganismo es fundamental para obtener una buena calidad e integridad del ADN (Lacey, 2012).

Extracción de ADN del patógeno

Actualmente existen varios métodos de extracción de ADN a partir de muestras de microorganismos, y la elección de estos métodos dependerá de los recursos económicos e infraestructura de cada laboratorio. Generalmente, los kits comerciales de extracción de ADN se caracterizan por presentar una alta eficiencia pero también un elevado costo. Otra opción disponible en metodologías de extracción es el uso de matrices o resinas, las cuales están disponibles en el mercado y son de bajo costo. La desventaja que presentan las matrices es que el ADN obtenido se preserva sólo a corto plazo ya que es susceptible a cambios en el pH en la solución, y eso afecta directamente en la integridad del ADN. En la Tabla 1 se describen algunos de los métodos de extracción más utilizados para los microorganismos.

Tabla 1. Comparación de los métodos de extracción de ADN clásicos y con kits más utilizados

Método de extracción de ADN	Rendimiento	Costo	Tiempo de trabajo	Pureza	Éxito
Fenol-cloroformo	alto	bajo	alto	alta	sujeto a la experiencia de quien realiza la técnica
Matrices	bajo	bajo	bajo	baja	no se aplica para todas las técnicas, por ej. RFLP o microsatélites
Kits comerciales	alto	alto	bajo	alta	alto; menor posibilidad de contaminación y menos pasos de trabajo

La extracción del ADN es el paso más importante del proceso de identificación de los patógenos. Una elevada calidad del ADN y la pureza del mismo determinarán el éxito en los pasos subsiguientes. Por lo tanto, los protocolos deben ajustarse de acuerdo al patógeno de interés para obtener los mejores resultados.

A continuación se detallan algunos protocolos adaptados para distintos tipos de patógenos de insectos.

Protocolo de extracción de ADN bacteriano

El proceso se inicia a partir de un cultivo bacteriano puro de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, incubado por 24 horas en agar nutritivo:

- Tomar una muestra del cultivo bacteriano y colocarla dentro de un tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf (1.5 ml) con 1 ml de agua destilada estéril. Centrifugar a 8000 G durante 1 minuto.
- Descartar el sobrenadante y volver a suspender el pellet en 200 µl de la matriz InstaGene (BioRad) que contiene resina Chelex al 6%.
- Agitar en vórtex por 10 segundos.
- Incubar la muestra a 56 °C por 30 minutos (en un baño térmico). En este punto accúa la matriz digiriendo las células.
- Agitar en vórtex por 10 segundos.
- Colocar la muestra en agua hirviendo por 8 minutos (para desactivar la matriz).
- Agitar en vórtex por 10 segundos.
- Centrifugar a 8000 G durante 3 minutos.
- Traspasar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf (1.5 ml) (Importante: no tomar material del pellet, ya que las partículas de la resina Chelex son inhibitoras de la enzima Taq. polimerasa durante la amplificación).
- Conservar el material a -20 °C hasta su utilización en la PCR.

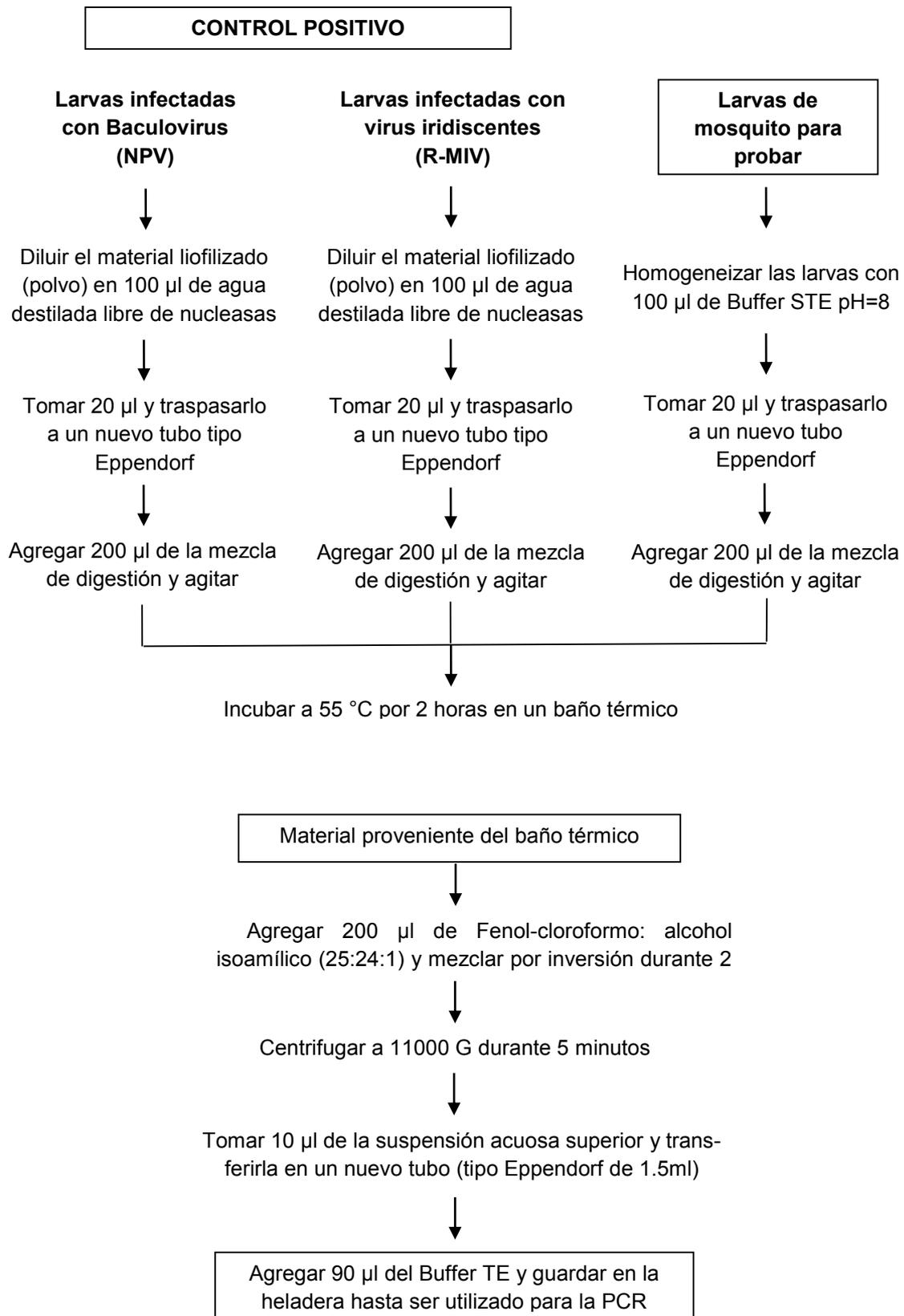
Recomendaciones: Preparar la resina Chelex en el momento de la extracción.

Protocolo de extracción de ADN para la detección de baculovirus y virus iridiscentes a partir de larvas de mosquitos

Preparar la mezcla de digestión de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen
SDS 10%	100 µl
EDTA 0,5M	50 µl
NaCl 5M	15 µl
Tris-HCl 1 M pH=8	10 µl
RNAse 4 µg/ml	10 µl
Proteinasa K 10 ng/ml	50 µl
Agua destilada	800 µl
Volumen final	1 ml = 1000µl

El protocolo lo presentamos en este caso como un esquema de trabajo. Los controles positivos provienen de la liofilización de larvas infectadas con los virus mencionados.



Protocolos de extracción de ADN de hongos

Método de fenol-cloroformo (adaptado de Azevedo *et al.*, 2000)

Se utiliza principalmente para la extracción de ADN de hongos pertenecientes la Clase Ascomycota siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- Producir micelio en un medio de cultivo líquido adecuado y mantener en agitación durante 48 a 96 horas a 27 ± 5 °C. Filtrar y lavar el micelio con agua destilada estéril para retirar los restos de medio de cultivo. Almacenar a -20 °C hasta su utilización en la extracción de ADN.
- Moler el micelio del hongo con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino (1 gr. de micelio). Colocar cada muestra en un tubo de microcentrifuga tipo Eppendorf (1.5 ml) el cual debe haber sido esterilizado previamente en autoclave. Preservar a 4 °C hasta su utilización.
- Agregar 800 µl del tampón de extracción al tubo Eppendorf conteniendo el micelio fúngico y agitar para lograr homogeneidad en la muestra.

Tampón de extracción:

- 1) 200 µl de TRIS HCl 1M (pH 8.0)
- 2) 50 µl de SDS 10% (pH 8.0)
- 3) 500 µl de EDTA 0.5 M (pH 8.0)
- 4) 50 µl de NaCl 5M
- 5) 10 µl de proteinasa K

- Colocar cada tubo tipo Eppendorf en un baño de agua a 60 °C durante 30 minutos.
- Añadir fenol (800 µl) a cada tubo Eppendorf.
- Centrifugar durante 15 minutos a 9000 G.
- Retirar la fase fenólica (amarilla).
- Completar la fase acuosa restante con igual volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
- Mezclar las fases y centrifugar a 9000 G por 15 minutos.
- Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo Eppendorf (400 µl) y adicionar 1/10 del volumen de NaCl 3M (40 µl).
- Adicionar dos volúmenes de etanol absoluto (freezer a -20 °C por más o menos 3 horas) para precipitar los ácidos nucleicos.
- Centrifugar a 9000 G por 15 minutos.
- Desechar el sobrenadante.
- Lavar el ADN precipitado con 500 µl de alcohol al 70% (preparar en el acto).
- Centrifugar varias veces hasta que el "pellet" esté limpio y adquiera una coloración clara. La centrifugación cambia los restos de fenol, cloroformo y el alcohol isoamílico por el alcohol 70%.
- Descartar el sobrenadante y esperar unos minutos para que el ADN se seque a temperatura ambiente, manteniendo el tubo Eppendorf abierto dentro del flujo laminar.

- Volver a suspender el ADN en 50-150 µl de tampón TE (Tris HCl 1 M - EDTA 0,5 M) = ADN concentrado. Mantener a -20 °C.

Es muy importante lavar el ADN ya que los solventes como el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico contaminan fácilmente el ADN e interfieren en la PCR, por lo que se debe evitar trasladar restos de estos solventes durante el proceso de purificación.

Recomendaciones: se debe utilizar una campana de extracción debido al uso de compuestos muy volátiles y tóxicos como el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico.

Método utilizando la matriz Chelex (al 10%)

En caso de que la extracción se realice a partir de los hongos pertenecientes al Phylum Zoopagomycota es necesario realizar la extracción de ADN a partir de insectos infectados por las dificultades de obtener cultivos in vitro de estas especies fúngicas (*)

Preservar los insectos infectados en alcohol al 96% y conservar en heladera a 4 °C hasta el momento de la extracción de ADN (según nuestros ensayos duración de 6 meses a 1 año).

- Tomar cada insecto con una pinza y colocarlo sobre un papel de filtro limpio durante 3 minutos (para quitarle el excedente de alcohol).
- Transferir cada insecto a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- Agregar al tubo Eppendorf 20 µl de buffer fosfato salino (PBS pH 7.2) y 5 µl de proteínaasa K (concentración: 10 mg/ml).
- Homogeneizar la mezcla utilizando un palillo (pestle) u homogeneizador “DNA free-pestle” (previamente esterilizado con baños de alcohol al 96% y secado en papel de filtro). En este paso presionar el insecto contra la pared del tubo hasta lograr desintegrarlo.
- Centrifugar a 7500 G por 30 segundos.
- Agregar 150 µl de la matriz Chelex al 10%.
- Incubar toda la noche a 56 °C.
- Al día siguiente incubar las muestras a 94 °C por 15 minutos (mantener los tubos con las tapas cerradas).
- Centrifugar a 7.500 G por 30 segundos.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf.
- Almacenar el ADN a -20 °C.

(*) Este protocolo fue adaptado y ajustado a partir de los utilizados en la Universidad de Copenhague, Facultad de Ciencias de la Vida, Dinamarca por proyectos en colaboración previos.

Determinación de la calidad y concentración del ADN

Una vez extraído el ADN del patógeno, es importante verificar la concentración, integridad y pureza del producto obtenido. La integridad del ADN generalmente es confirmada a partir de una elec-

troforesis en geles de agarosa al 1%, donde se debe observar una única banda de peso molecular elevado y, por lo tanto, muy cerca del pozo donde fue introducida la muestra de ADN. La concentración de ADN se puede estimar en el mismo gel de agarosa usando marcadores de masa molecular o también usando un espectrofotómetro o un Nanodrop, donde se calcula la cantidad de ADN por absorbancia a 260 nm y la pureza de la muestra con la proporción de absorbancia 260/280 nm. El Nanodrop es un espectrofotómetro más eficiente debido a que cuantifica volúmenes muy pequeños de muestra de ADN, desde 1 µl, si se compara con el espectrofotómetro que utiliza mínimo 10 µl de muestra de ADN. La concentración de ADN de cada muestra debe ser ajustada a 5 ng/□ para poder realizar la amplificación de una secuencia específica de ADN.

Amplificación de genes específicos mediante la técnica de PCR

La técnica de “reacción en cadena de la polimerasa” (Polymerase Chain Reaction, PCR), consiste en la amplificación de fragmentos de ADN específicos en presencia de “cebadores” (primers), ADN polimerasas y los precursores del ADN (dideoxinucleótidos) (Mullis *et al.*, 1986).

Para realizar la técnica de PCR es necesario mezclar los siguientes componentes:

- **El ADN extraído de cada patógeno**, para ser utilizado como molde del fragmento de interés (generalmente son secuencias parciales de genes o regiones no codificantes).
- **Marcadores moleculares, “primers”**, que son secuencias de nucleótidos de cadena simple que hibridan con el ADN de la muestra para definir la región del ADN que será amplificada. También denominados cebadores u oligonucleótidos.
- **Mezcla (mix) de la reacción de PCR**, que es una mezcla de reactivos formada por la enzima ADN polimerasa que es utilizada para crear las copias de ADN, los nucleótidos (o dNTP), el tampón o buffer de reacción y sales como MgCl que estabilizan la enzima.

El principio de la PCR radica en tres pasos secuenciales que constituyen un ciclo de PCR:

- **1° paso (94-96 °C)**: consiste en la desnaturalización del ADN a alta temperatura, debido a la ruptura de los enlaces de hidrógeno que unen las cadenas de nucleótidos del ADN.
- **2° paso (30-60 °C)**: en esta etapa los marcadores moleculares o cebadores se unen a la secuencia de ADN molde (hebra simple) por complementariedad de nucleótidos. Generalmente la temperatura de esta etapa se define de acuerdo con la secuencia de nucleótidos de los marcadores moleculares.
- **3° paso (72-75 °C)**: en esta etapa la enzima ADN polimerasa realiza la extensión de la molécula de ADN por la adición de los nucleótidos complementarios al ADN molde.

Generalmente estos 3 pasos del ciclo de la PCR se repiten entre 25 a 40 veces para obtener grandes cantidades del fragmento de ADN de interés. Durante cada ciclo, las cadenas complementarias de ADN son copiadas por extensión de cebadores que se unen en posiciones opuestas. De esta forma, cada cadena de ADN recientemente amplificada se usa como plantilla en el siguiente ciclo, resultando así en la acumulación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los dos cebadores (Figura 2).

En todas las reacciones de PCR es recomendado adicionar un control positivo (muestra conocida que amplifica correctamente en las condiciones de PCR) y también un control negativo que deberá ser realizado con el mix de la PCR, pero sin adicionar el ADN molde.

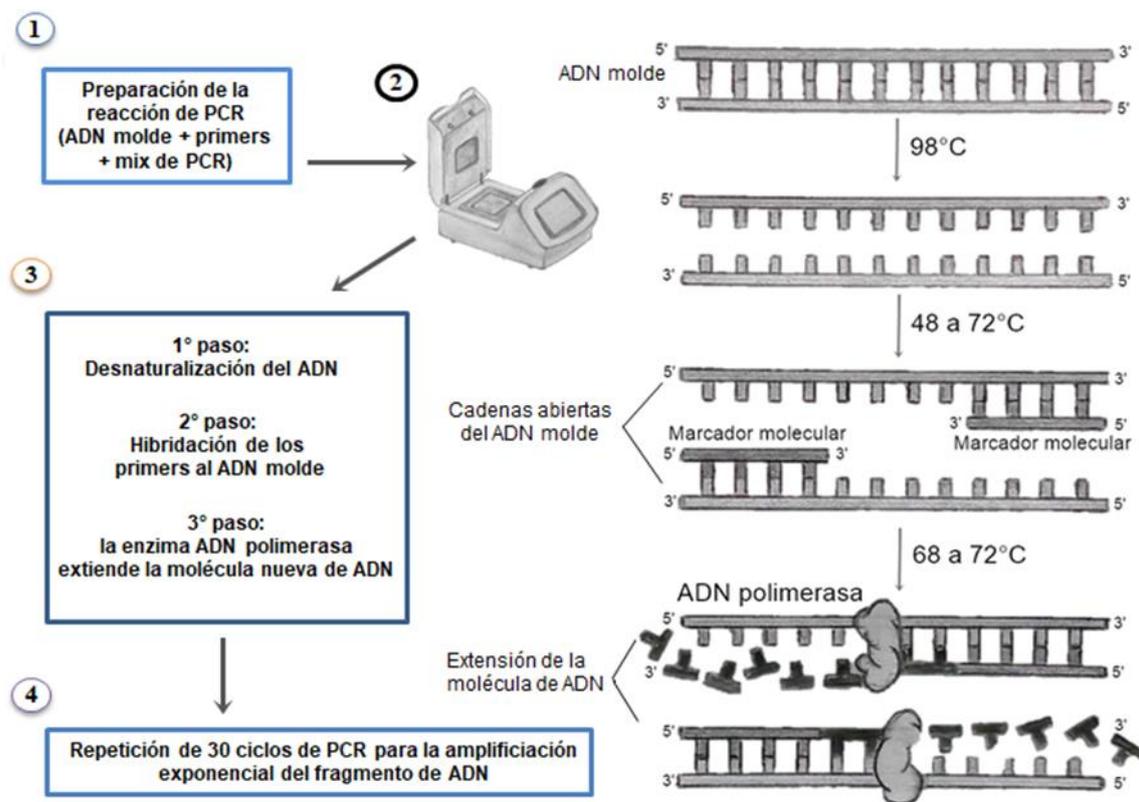


Figura 2. Etapas de la reacción de PCR. 1: Preparación de la reacción de PCR. 2: Introducción de las muestras en el termociclador. 3: Descripción del primer ciclo de PCR. 4: Repetición del ciclo de PCR para la amplificación exponencial del fragmento de interés.

Para realizar la identificación y la caracterización de los patógenos de insectos son utilizadas secuencias específicas de DNA que permiten estudiar las relaciones filogenéticas entre varios taxones y dentro de los taxones. La amplificación de ADN ribosómico (ADNr), fue una de las primeras aplicaciones de la PCR porque las secuencias de ADNr codifican para la formación de ARN ribosómico y son encontrados universalmente en todas las células vivas.

Las secuencias de ADNr se presentan como un grupo de genes (“clusters” génicos), el cual es repetido en tándem centenas de veces. Cada unidad de repetición (“cluster génico”) incluye 3 genes: ADNr 18S, ADNr 5,8S y ADNr 28S, los cuales son separados por dos regiones denominadas “espaciadores transcritos internos” (en inglés, “ITS”). Debido a que los genes 18S y 28S presentan regiones altamente conservadas, se diseñaron marcadores moleculares o “primers” universales para la amplificación de la región comprendida entre el ITS1, 5,8S y el ITS2 de cualquier especie fúngica (Driver *et al.*, 2000). Los análisis comparativos de las secuencias de nucleótidos de los genes del ADN ribosómico y los ITS permitieron clarificar las relaciones filogenéticas entre varios patógenos de insectos.

Tabla 2: Marcadores moleculares más utilizados para la identificación de los patógenos de insectos

Nombre del primer	Secuencia de los primers (5'-3')	Región del gene	Tamaño de la secuencia génica (Pb)	Patógeno	Referencias
ITS5 ITS4	(GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (TCCTCCGCTTATTGATATGC)	ITS1-5.8s-ITS2	600	hongos	White <i>et al.</i> , (1990)
16SF 16SR	(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (ACGGCTACCTTGTACGACTT)	16S	1500	bacterias	Weisburg <i>et al.</i> , (1991).
prPH1 prPH2	(TGTA AACGACGGCCAGTNR CNGARGAYCCNTT) (CAGGAAACAGCTATGACCDGGNGCRAAYTCYTT)	polyhedrin (polh)	500	baculovirus	Jehle <i>et al.</i> , (2000)

Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN que son amplificados por la técnica de PCR deben ser separados por electroforesis en geles de agarosa para determinar el tamaño y confirmar la obtención de una única banda correspondiente al gen de interés (tabla 2). Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN son determinados por comparación mediante la inclusión de un marcador de peso molecular en la electroforesis en geles de agarosa (□100 pb).

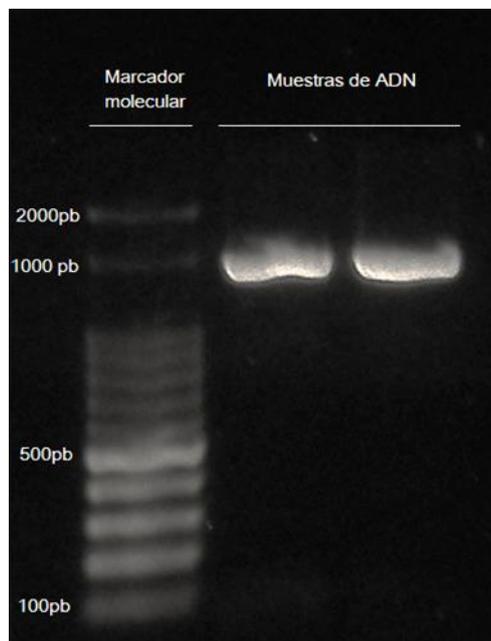


Figura 3. Gel de agarosa con dos muestras de ADN fúngico, donde se ha amplificado parte del gen de la β -tubulina. Observar el marcador de peso molecular y a la izquierda el peso en pares de base (pb) de cada banda del marcador molecular.

Secuenciación, comparación de secuencias génicas con bases de datos e identificación taxonómica a partir de la construcción de árboles filogenéticos

Una vez que las bandas se han observado en el gel de agarosa y son bandas nítidas, sin bandas accesorias, la muestra debe ser purificada con un kit de purificación de ADN. El siguiente paso es el envío de la muestra para lograr su secuenciación. El proceso de secuenciación consiste en determinar el orden de los nucleótidos (Adenina, Guanina, Citosina y Timina) de nuestra muestra problema de ADN. Las utilidades de información del fragmento de ADN son muy amplias y van a depender del objetivo de nuestra investigación.

En general, para identificar un patógeno, una vez que recibimos la información de la secuenciación, debemos armar nuestro fragmento del gen para poder comparar con una base de datos. Los programas más utilizados para alinear y editar secuencias de ADN y proteínas son por ejemplo, ClustalW, BioEdit, Paup, Staden, Genedoc, algunos de los cuales son de uso libre y gratuito. Las bases de datos de los nucleótidos son una colección de secuencias de ADN o proteínas que contienen información relevante, y una interfaz para poder acceder a la propia base de datos. Las tres bases de datos principales de nucleótidos son: el archivo de Nucleótidos (ENA) en el Instituto Europeo de Bioinformática del Laboratorio de Biología (EMBL-EBI) en Hinxton, Reino Unido; el banco de datos de ADN de Japón (DDBJ) en el Instituto Nacional de Genética en Mishima, Japón; el GenBank en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), Biblioteca Nacional de Medicina, Institutos Nacionales de Health en Bethesda, Maryland, EE. UU. (Karsch-Mizrachi *et al.*, 2018).

A partir de la comparación de las secuencias obtenidas con las disponibles en las bases de datos mencionadas previamente se construyen árboles de filogenia. Estos son esquemas en los que es posible visualizar las relaciones evolutivas entre los organismos. Un software muy utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos es el MEGA, cuyas siglas en inglés significan “Molecular Evolutionary Genetics Analysis”, es un programa de dominio público que no tiene costo de uso (<https://www.megasoftware.net/>).

Bibliografía consultada / recomendada

- Azevedo, A. C. S.; Furlaneto M. C.; Sosa-Gómez, D. R. & Fungaro, M. H. P. (2000). Molecular characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. *Scientia Agricola*, 57: 729-732.
- Bischoff, J. F.; Rehner, S. A.; Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101 (4): 512-530
- D'Alessandro, C. P.; Jones, L. R.; Humber, R. A.; López Lastra, C. C.; Sosa-Gómez, D. R. (2013). Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences. *Journal of Basic Microbiology*, 53: 1-11.

- Driver, F.; Milner, R. J. & Trueman, J. W. H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104: 143–150.
- Karsch-Mizrachi, I.; Takagi, T.; Cochrane, G. International Nucleotide Sequence Database Collaboration. The international nucleotide sequence database collaboration. *Nucleic Acids Res.* (2018); 46(D1):D48-D51. doi:10.1093/nar/gkx1097
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*. 51: 263-73. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032
- Rehner, S. A. & Buckley E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*. 97(1): 84–98.
- Rehner, S. A.; Minnis, A. M.; Sung, G. H.; Luangsaard, J. J.; Devotto, L.; Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103: 1055-1073.
- Schlotterer, C. (2004). The evolution of molecular markers –just a matter of fashion? *Nature Reviews* 5: 63-69.
- Velazquez, L. P .A.; Aragon Martinez, M. C.; Romero, A. C. (2014). Extracción y Purificación de ADN. En: *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Editors: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., Rocha-Munive, M. G. Publisher: SEMARNAT. México. 251 p.
- White, T. J.; Bruns, T. D.; Lee, S. B.; Taylor, J. W., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (Eds.), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315- 322

Anexos

Tinción de preparados

- Aceto-orceína (hongos)
- Azul de algodón (hongos)
- Giemsa (microsporidios y otros)
- Gram (bacterias)
- Schaeffer – Fulton (bacterias)

Preparados en fresco

1. Colocar sobre un portaobjetos limpio, utilizando un ansa o una pinza, una pequeña cantidad de muestra o cultivo junto con una gota de agua destilada estéril o solución fisiológica.
2. Cubrir con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas de aire, en la Fig. 1 se detalla el procedimiento de extendido utilizando un cubreobjetos colocado a 45°, el objetivo es separar la muestra y dejar una película fina y clara para observar al microscopio óptico.
3. Al microscopio, se observa a menor aumento (10x y 40x) y de ser necesario observar a mayor aumento (100x).

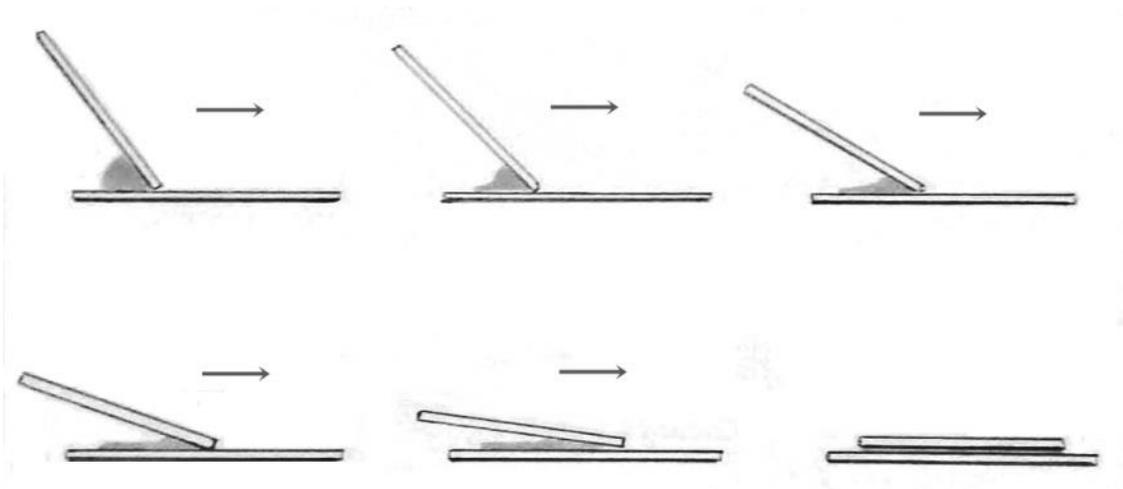


Figura 1. Extendido en fresco

Preparación del frotis para coloración

1. Hacer el frotis colocando una muestra extendida con el ansa en el centro de un portaobjetos limpio; debemos lograr una película delgada y uniforme, de ser necesario podemos usar una gota de solución fisiológica o agua esterilizada.
2. Secar el preparado en el aire caliente sobre la llama del mechero. Se debe fijar tomando el preparado desde un extremo, y pasar el reverso sobre la llama de un mechero tres veces.
3. Secar el portaobjetos en el aire caliente sobre la llama del mechero durante 1 minuto.
4. Una vez frío, seguir con el protocolo de tinción seleccionado.

Hongos

Aceto-orceína

Disolver 1 g de orceína en 45 ml de ácido acético concentrado (glacial); hervirlo agitando ocasionalmente, mantener la ebullición durante aproximadamente 10 minutos. Dejar enfriar y filtrar con papel de filtro. Para su uso añadir a 4,5 ml del colorante 5,5 ml de agua destilada. Guardar el colorante preparado refrigerado.

Azul de algodón-lactofenol de Ammann

Solución de azul algodón:

- Solución saturada de azul algodón (azul anilina soluble): 10 ml
- Glicerol: 10 ml
- Agua: 80 ml

Mezclar esta solución con Lactofenol de Ammann en partes iguales.

Preparación de material para microscopía óptica

Realización de los preparados por medio de “extendidos” de material (tejidos sanos o infectados con patógenos de acuerdo a disponibilidad) los cuales serán coloreados con la tinción Giemsa.

Protocolo de Tinción Giemsa:

Preparar buffer fosfato 0.02 M:

- Solución 1: 28,39 g de Na_2PO_4 disuelto en 1 litro de agua destilada.
- Solución 2: 31,21 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 1 litro de agua destilada.

Mezclar 55 ml de la solución 1 con 45 ml de la solución 2 y llevar a 1 litro con agua destilada, preparar una solución de trabajo de buffer fosfato con pH entre 6.9 – 7.

Preparar fijador para Giemsa

- 94% alcohol absoluto

- 5% solución de formalina
 - 1% ácido acético
1. Realizar un extendido del tejido infectado sobre un portaobjetos.
 2. Dejar secar la preparación al aire.
 3. Cubrir el extendido con alcohol metílico durante 3 minutos (fijación).
 4. Volcar el alcohol en exceso.
 5. Cubrir el extendido con solución Giemsa 10% (pH 7.41) durante 10 minutos.
 6. Lavar el preparado con agua corriente (abundante).
 7. Dejar secar el portaobjetos al aire.

Bacterias

Protocolo de tinción de Gram

Este es un método clásico usado generalmente para identificar especies de bacterias. Divide a las bacterias en dos grupos: Gram (+) y Gram (-). Los dos grupos se diferencian por los componentes de la pared celular. Se deben usar cultivos preferentemente jóvenes (de 18- 24 horas) para que las diferencias en las paredes celulares sean más evidentes. Se utilizan dos colorantes, el colorante primario es el cristal violeta, el colorante de contraste es la safranina. El mordiente para la safranina es el lugol, y como decolorante podemos usar alcohol/acetona.

1. Preparar extendidos de bacterias sobre Portaobjetos esmerilados (identificarlos con lápiz) y fijarlos con calor (exponer al flameado directo).
2. Teñir con cristal violeta por aproximadamente 30 segundos. Enjuagar con agua destilada.
3. Cubrir con tintura de yodo- Gram por 30 segundos. Enjuagar con agua destilada.
4. Decolorar con 95% etanol por 10-20 segundos.
5. Cubrir con el colorante de contraste (safranina) por 20-30 segundos. Enjuagar con agua destilada y dejar secar al aire.
6. Examinar los preparados bajo el microscopio óptico, con aumento 100X (con aceite de inmersión).

Las bacterias Gram positivas se ven de color violeta y las Gram negativas rojas.

Protocolo tinción de Schaeffer - Fulton

Las endosporas de bacterias pueden estar localizadas en las células vegetativas en posición terminal, subterminal, central. Las endosporas aparecen como estructuras densas y blancas en las células al usar microscopio óptico con contraste de fases. También se pueden observar cuerpos parasporales como estructuras dentro de las células.

Protocolo de Tinción de esporas:

Utilizar verde de malaquita para teñir las endosporas. Las endosporas se teñirán de verde y el resto de las células de color rojo.

1. Preparar un extendido de los cultivos de bacterias, dejar secar al aire y fijar con calor.
2. Ubicar los portaobjetos sobre un frasco para tinciones y colocar en agua hirviendo.
3. Cubrir los extendidos con pequeños trozos de papel absorbente y mantener siempre saturado con colorante verde malaquita (5% solución acuosa), continuar el calentamiento durante 5 minutos.
4. Lavar con agua corriente.
5. Teñir con tintura de contraste (safranina) por 30 segundos. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
6. Examinar bajo microscopio óptico con aumento 100X (con aceite de inmersión).

Medios de cultivo, colorantes y antibióticos (orden alfabético)

Medios de cultivo

Agar Extracto de Malta (Malt Extract Agar, MEA)

- Agar 20 g
- Extracto de malta 20 g
- Peptona de carne 10 g
- Dextrosa 20 g
- Agua destilada 1 litro

Agar Nutritivo para Bacterias (Lacey, 2012)

- Extracto de carne 3 g
- Peptona 5 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1 litro

Agar Papa Glucosa (APG) = APG (agar-papa-glucosa)

- Agar 20 g
- Extracto de papa 250 g
- Agua destilada 1 litro
- Glucosa 10 g

Preparación (para ½ litro): Pesar 125 g de papas peladas, lavadas y cortadas en cubitos. Poner 500 ml de agua destilada en un Erlenmeyer de un litro de capacidad. Calentar 30 minutos. Filtrar con una tela de voile o muselina en un embudo de vidrio. Llevar el volumen a 500 ml si es necesario. Poner en agitador con calentador, agregar el agar, finalmente agregar la glucosa y sacar. Esterilizar en autoclave 15 minutos.

Agar Papa Sacarosa

- Agar 20 g
- Sacarosa 10 g
- Extracto de papa 250 g
- Agua destilada 1 litro

Preparación: Igual que APG.

BHIA 1/10 (para Trichomycetes)

- BHI 3,7 g
- Tiamina 200 mg
- Biotina 50 mg
- Agua destilada 1 litro
- Agar 15 g

Nota: Vitaminas (biotina y tiamina) pueden no ser necesarias para todos los aislamientos.

CMDP (Corn Meal + Dextrosa + Peptona)

- Agar 20 g
- Harina de maíz 40 g
- Peptona de carne 10 g
- Dextrosa 5 g (sin calor)
- Agua destilada 1 litro

Preparación: Cocinar 40 g de harina de maíz en 1 litro de agua destilada (con agitación) durante 15'-20'. Luego colar con una media o tela de voile y dejar enfriar al aire. Agregar el agar, disolver, y calentar hasta que se agarice el medio por completo. Al final agregar la peptona y dextrosa, mezclar, y luego esterilizar en autoclave 15 minutos.

Egg Yolk / Sabouraud Maltosa Agar (EYSMA). Entomophthorales (Papierok & Hajek, 1997)

- Maltosa 24 g
- Peptona 6 g
- Extracto levadura 6 g
- Agar 9 g
- Huevos 12 unidades
- Agua destilada 600 ml

Preparación: En cada uno de los 3 recipientes de vidrio colocar 200 ml de H₂O. A cada uno agregar 8 g de maltosa y a cada uno de los restantes agregar 2 g de peptona, 2 g de extracto de levadura y 3 g de agar.

- cubrir y esterilizar en autoclave 15'
- colocar 12 huevos en etanol 50% por 30 minutos
- bajo la cámara de flujo laminar agregar 2 yemas de huevos a cada recipiente; evitar la coagulación agregándolos cuando el medio esté tibio.
- mezclar los ingredientes y volcar en las cápsulas de Petri.

SMAY

- Agar 3 g
- Extracto de levadura 2 g
- Peptona de carne 2 g
- Maltosa 8 g
- Agua destilada 100 ml

Preparación: poner el agua destilada a agitar sin calor, e ir incorporando los ingredientes, salvo la maltosa. Luego calentar hasta cristalizar, agregar 8 g de maltosa y mezclar con agitador. Esterilizar en autoclave 15 minutos

- poner 2 huevos por cada 100 ml, previamente sumergidos durante media hora en 500 ml de agua destilada y 500 ml de alcohol.
- bajo cámara de flujo laminar, sacar las 2 yemas y agregarlas al medio esterilizado. Agitar las yemas rápido para que no se endurezca, sino dejar el agitador y mezclarlo. Pasar a cápsulas.

Glen's Media. Protoplastos Entomophtorales (Beauvais & Latgé, 1988)

- Glucosa 4 g
- Extracto de levadura 5 g
- Lactalbúmina hidrolizada 6,5 g
- NaCl 7,7 g
- Agua destilada 1 litro

Preparación: controlar que el pH del medio sea 6.5. Esterilizar durante 20 minutos a 121 °C, y antes de pasar a las placas agregar 10% FBS (suero fetal bovino esterilizado por filtración).

KPS (para nit-mutantes)

- Papas 200 g
- Sacarosa 20 g
- KClO₃ 15 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1 litro

Preparación: Pelar y cortar las papas y esterilizar en autoclave con 1 litro de H₂O destilada por 15'. Filtrar y llevar a 1 litro, agregarle el resto de los ingredientes y volver a esterilizar en autoclave durante 20'.

Lactofenol de Amann

- Fenol (cristales) 20 g
- Ácido láctico 20 g (16 ml)
- Glicerol 40 g (31 ml)
- Agua destilada 20 ml
- Azul de algodón 1 g

Medio Mínimo (MM)

- Sacarosa 30 g
- NaNO₃ 2 g
- KH₂PO₄ 1 g
- MgSO₄.7H₂O 0,5 g
- KCl 0,5 g
- Agar 20 g
- Elementos traza 0,2 ml
- Agua destilada 1 litro

Elementos traza

- Ácido cítrico 5 g
- ZnSO₄.7H₂O 5 g
- FeSO₄.7H₂O 4,75 g
- Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 1 g
- CuSO₄. H₂O 250 mg
- MnSO₄. H₂O 50 mg
- H₃BO₄ 50 mg
- NaMoO₄.2H₂O 50 mg
- Agua destilada 1 litro

Nota: es conveniente esterilizar los elementos traza utilizando filtro de 0.22 μ m y agregarlo al medio antes de pasar a placa

MPM (Medio Paterson Modificado)

- Agua destilada 1 litro
- KH₂PO₄ 0,68 g
- MgSO₄.7H₂O 0,5 g
- KCl 0,15 g

- Extracto de levadura 0,5 g
- NH₄NO₃ 1 g
- D glucosa 18,4 g
- Solución Vogel 0,2 ml
- Agar 15 g
- Colorante rojo 6 gotas

Medio Selectivo para Aislar *Beauveria bassiana* y *M. anisopliae* a partir de suelo (Dobersky & Tribe, 1980)

- Agua destilada 1 litro
- Glucosa 40 g
- Peptona (Difco) 10 g
- Agar 15 g
- Cristal violeta 0,01 g
- Cycloheximida o Dodine 0,25 g
- Cloranfenicol 0,5 g

Nota: El cloranfenicol puede ser esterilizado en autoclave separadamente, a una concentración de 10 mg/cm³, y adicionado al resto del medio cuando éste esté frío, o bien esterilizado por filtración.

MYPGP para Bacterias

- Extracto de levadura 15 g
 - Caldo Muller-Hinton 10 g
 - Glucosa 2 g
 - K₂HPO₄ 3 g
 - Piruvato de sodio 1 g
 - Agar 150 g
 - Agua destilada 1 litro
- pH 7,3-7,5

Oat Meal Agar (agar avena)

- Avena arrollada 65 g
- Agar-agar 20 g
- Agua destilada 1 litro

- Preparación:
- 1) Cocinar la avena en 1litro de agua (60 °C) por 30 minutos.
 - 2) Filtrar (por media).
 - 3) Agregar el agar.
 - 4) Ajustar el volumen 1litro.

- 5) Esterilizar por medio de autoclave durante 30 minutos. Esperar 24 horas y esterilizar de igual modo por 30 minutos otra vez. Entre ambas esterilizaciones llevar el volumen a un litro.
- 6) Dejar enfriar 15 minutos antes de agregar antibiótico (1 g/l estreptomina, 2 g/l penicilina)

PYG Agar (Peptona, extracto de levadura + glucosa)

- Peptona 1.2 g
- Extracto de levadura 1.2 g
- Glucosa 3 g
- H₂O destilada 1 litro
- Agar 15 g

PYG líquido

- Peptona 1.3 g
- CaCl₂.2H₂ 0.37 g
- Colesterol 0.34 g
- Extracto de levadura 1.3 g
- Lecitina de soja 1 g
- Dextrosa 3.3 g
- Agua destilada 1 litro

Preparación: Disolver los ingredientes en 800 ml y luego llevar a volumen final de 1litro.

PMAY (Medio para *Metarhizum rileyi*)

- Agar 15 g
- Maltosa 40 g
- Extracto de levadura 15 g
- Extracto de papa 170 g
- Agua destilada 1 litro

SABOURAUD dextrosa agar con extracto de levadura 1% y 2%*

- Peptona 10 g
- Dextrosa 20 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1 litro
- Extracto de levadura 10 g
- 20 g*

SABOURAUD maltosa agar con extracto de levadura 1% y 2%*

- Peptona 10 g
- Maltosa 20 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1 litro
- Extracto de levadura 10 g
- 20 g*

SDYA suplementado con huevo y leche

- SDYA 800 ml
- Leche descremada estéril 8 ml
- Yemas de huevo 5 unidades

- Preparación:
- 1) Preparar y esterilizar 800 ml de SDYA.
 - 2) Esterilizar 8ml de leche (descremada) por 10 minutos en autoclave (no se debe poner marrón).
 - 3) Preparar 5 yemas de huevo (esterilizada en 50% alcohol y 50% H₂O destilada) y mezclarlas con la ayuda de un agitador con la leche. Luego agregar SDYA.
 - 4) Pasar a cápsulas. Todo debe ser hecho bajo cámara de flujo laminar.
Para 300 ml de medio: 2 yemas
Para 500 ml de medio: 3 yemas

YPSS (Medio Emerson)

- Extracto de levadura 4 g
- H₂KPO₄ 1 g
- MgSO₄ 0.5 g
- Almidón soluble 15 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1 litro

- Preparación:
- 1) Disolver el agar y el almidón separados, el agar en 200 ml de H₂O destilada y el almidón en 200ml de H₂O destilada, una vez que estén bien disueltos colocarlos en un Erlenmeyer.
 - 2) Disolver el resto de los ingredientes en 500 ml de H₂O destilada, cuando estén bien homogeneizados unir con el agar y el almidón del punto 1.
 - 3) Ajustar el volumen a 1litro.
 - 4) Autoclave: 20 minutos.

Para todos los medios solidos

Pasar el medio líquido a cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro previamente esterilizadas en autoclave, bajo condiciones de esterilidad, bajo cámara de flujo laminar.

El material de vidrio y los medios de cultivo se esterilizan en autoclave de Chamberland durante 20 minutos a 120 °C y 1 atmósfera de presión. Dejar el material de vidrio a secar en estufa de secado después de esterilizado.

NOTA IMPORTANTE: Se preparará medio litro de cada medio de cultivo a utilizar durante la curso de la materia, los Erlenmeyers deberán ser rotulados con el nombre del medio de cultivo y la fecha, además se colocará cinta indicadora de esterilización en cada material a utilizar. Los medios de cultivo se guardarán en heladera hasta su utilización.

Colorantes

Aceto-Orceína 1 % (Colorante vital)

- Orceína (natural o sintética) 1 g
- Ácido acético glacial 45 ml

Preparación: Disolver la aceto- orceína natural en ácido acético glacial caliente, diluir 1:1 con agua destilada y hervir por lo menos 5 minutos (ideal 30'). Cuando hierve reemplazar el volumen perdido con ácido acético glacial 50%. Filtrar por lo menos 2 veces con papel de filtro para remover el pre-filtrado.

Nota: Este colorante requiere ser clarificado por filtración periódicamente.

Antibióticos

Ampicilina (solución madre 1000x)

- Disolver 100 mg de ampicilina en 1ml de agua destilada
- Usar 0,1ml de antibiótico por cada c/100 ml de medio de cultivo

Cloranfenicol – Gentamicina

- Cloranfenicol: 0,125 g
 - Gentamicina: 0,0125 g
 - Agua destilada estéril: 25 ml
- Usar 0,1ml de antibiótico por cada c/100 ml de medio de cultivo

Penicilina-Estreptomicina

- Penicilina 40000 unidades: 1150 mg/50 ml H₂O destilada

- Estreptomicina (SO₄ estreptomicina) 80000 unidades: 5228,5 mg/50 ml H₂O
Usar 100 ml de antibiótico por c/100ml de medio de cultivo.

Nota: En todos los casos se procede igual: mezclar en agitador hasta dilución total del antibiótico y esterilizar por filtración con filtro tipo millipore 0.22 µm (diámetro de poro). Fraccionar en frascos esterilizados con tapas de goma, sellar los frascos con parafilm y etiquetar con nombre y fecha. Se pueden conservar en freezer -20° C o en heladera.

Bibliografía consultada / recomendada

- Beauvais, A. & Latgé, J. P. (1988). A simple medium for growing Entomophthoralean protoplasts. *Journal of Invertebrate Pathology* 51, 175-178.
- 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* *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74 (1) 95- 100.
- Goettel, M. & Inglis, G. D. (1997). Fungi Hyphomycetes, (cap. VI pp 213-250) IN: *Manual of techniques in Insect Pathology*, Ed. L. Lacey. Ac. Press, San Diego, USA, 409 pp.
- Lacey, L. (2012). Ed. *Manual of techniques in Insect Pathology*, Academic Press, San Diego, USA. 409 pp.
- Papierok, B & Hajek, A. E. (1997). Fungi Entomophthorales (cap. V, pp187- 212) IN: *Manual of techniques in Insect Pathology*, Ed. L. Lacey. Ac. Press, San Diego, USA, 409 pp.
- Keller, S. (2007). Systematics, taxonomy and identification. (In:) *Arthropod-pathogenic Entomophthorales: Biology, Ecology, Identification*. S. Keller. COST Office, Luxembourg: 111–12.

Glosario

Agresividad: es una variable cuantitativa que se estima comparando el Tiempo Letal 50 o 90 (TL₅₀, TL₉₀) entre aislamientos o cepas fúngicas o bien entre distintos aislamientos de otros patógenos.

Antagonismo: el efecto de dos patógenos o agentes sobre un hospedador es menor que el efecto del agente más activo en forma individual.

Bacteremia: presencia de bacterias en la hemolinfa del insecto o invertebrado hospedador, sin producción de toxinas ni otros efectos nocivos o deletéreos.

Cuerpo Parasporal: partícula que está a lo largo de la espora o incluida en el esporangio, formada durante la esporulación de especies de *Bacillus*. Si la inclusión es cristalóide esa especie es denominada cristalífera.

Diagnosis: distinguir una enfermedad de otra, la determinación de los signos y síntomas, etiología, patogénesis, fisiopatología y morfología son los parámetros esenciales para realizar una diagnosis.

Enfermedad: falta del estado de normalidad o salud. Condición que representa la respuesta de un animal a una injuria o daño. Un disturbio de alguna estructura, órgano o tejido en general.

Entomopatógeno: microbio que infecta a insectos, (o en un sentido más amplio se incluyen arácnidos u otros artrópodos) los cuales usualmente causan mortalidad en el hospedador.

Enzootia: es cuando usualmente hay una baja prevalencia de casos de una enfermedad causada por un patógeno en una población constantemente presente.

Epizootia: es un pico de número de casos inusualmente grande de una enfermedad causada por un patógeno. Es una fase de la enfermedad con elevada mortalidad.

Epizootiología: es el campo que concierne al estudio de las enfermedades de animales sobre la base de fenómenos masivos. Concierne a enfermedades que ocurren en grupos de animales o poblaciones más que a animales individuales.

Espora de Resistencia: espora con una pared gruesa capaz de permanecer viable durante condiciones adversas o desfavorables, permaneciendo quiescente por un tiempo antes de germinar. En el caso de los hongos, por ejemplo, pueden ser las cigosporas, acigosporas, oosporas.

Factores de virulencia: propiedades de los microorganismos (m.o.) patógenos que permiten evitar o detener la función del sistema inmune de defensa del hospedador.

Filamento polar: organela filiforme que está dentro de la espora de los microsporidios, extendiéndose hacia atrás, y que típicamente se enrolla varias veces justo dentro de la pared de la espora. Una parte del aparato de extrusión será evertido e inoculará el esporoplasma en la célula hospedadora.

Hospedador: invertebrado que aloja algún otro organismo.

Infección: entrada o introducción de un microorganismo (m.o.) patógeno en un hospedador susceptible resultante en la presencia del m.o. dentro del cuerpo, cause o no efectos patológicos detectables.

Infectividad: es la capacidad o cualidad de ser infectivo, habilidad de producir infección.

Patogenicidad: es la cualidad de ser patogénico, se define también como el potencial de producir enfermedad, es aplicado a grupos de especies o a m.o. Se la considera con frecuencia como la habilidad determinada genéticamente de causar enfermedad. La patogenicidad es cualitativa.

Patógeno: causa específica de una enfermedad, un m.o. capaz de producir enfermedad bajo condiciones normales de resistencia del hospedador.

Patógeno Facultativo: patógeno que puede infectar y multiplicarse en un animal hospedador, pero que también es capaz de multiplicarse en el ambiente. Los patógenos facultativos suelen ser fácilmente cultivados *in vitro*.

Patógeno Obligado: patógeno que puede multiplicarse en la naturaleza solo dentro del cuerpo de hospedadores específicos, y que usualmente tienen un rango hospedador restringido o estrecho. Generalmente pueden ser cultivados *in vitro* con dificultad, o bien no pueden ser mantenidos en cultivo.

Patógeno Potencial: m.o. que no tiene método de invadir o infectar a un hospedador pero puede multiplicarse y causar enfermedad si logra acceder o entrar al cuerpo del hospedador, por ejemplo a través de una herida. Pueden crecer fácilmente en cultivo *in vitro*.

Per os: modo de ingreso al hospedador por medio de la boca, por ingestión.

Prevalencia: número total de casos de una enfermedad en un momento dado y en una población determinada.

Septicemia: condición mórbida causada por la multiplicación de los m.o. en la hemolinfa o sangre.

Signo: cualquier manifestación de enfermedad indicada por un cambio morfológico o estructural, por ejemplo, color, textura, consistencia, etc.

Síndrome: es el conjunto de signos y síntomas que son característicos de una enfermedad particular.

Sinergismo: acción cooperativa de dos patógenos o agentes infecciosos, de modo que el efecto conjunto es más grande o más prolongado que si actuaran en forma independiente.

Síntoma: cualquier aberración en la función, incluyendo el comportamiento, que se manifieste por causa de la enfermedad.

Toxemia: condición producida por la diseminación de toxinas en la hemolinfa.

Transmisión: es el pasaje de una enfermedad de un individuo a otro, la transferencia o transporte de un agente infeccioso de un reservorio a un hospedador susceptible.

Transmisión Horizontal: transmisión de un agente infeccioso en el espacio, de un individuo a otro, exceptuando la transmisión vertical. Este tipo de transmisión puede ser a través de vectores o por medio de la diseminación de partículas a través de agentes físicos (viento, lluvia, etc.).

Transovárica: modo de transmisión a través del pasaje del m.o. de la madre al huevo dentro del ovario.

Trans-ovum: transmisión de un patógeno de una generación a la siguiente por medio del huevo (en o sobre el huevo). La transmisión transovárica es un caso especial de transmisión trans- *ovum*.

Transmisión Vertical: es la transmisión directa de un agente infeccioso a través del tiempo de una generación a la siguiente, de los padres a la progenie.

Viabilidad: es la capacidad de crecer y desarrollarse, es la capacidad o poder de germinación de las esporas.

Virulencia: es la capacidad de un m.o. de producir enfermedad o injurias a un hospedador. Es el grado de patogenicidad dentro de un grupo de especies. La virulencia puede ser cuantificada. De este modo un m.o. puede ser avirulento, virulento o altamente virulento y, de acuerdo a algunos autores, esta habilidad no está genéticamente determinada.

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