



Productividad y sustentabilidad
de la **agricultura familiar**
para la seguridad alimentaria
y economía rural

PROTOCOLOS PARA FORMULACIÓN Y
APLICACIÓN DEL BIO-INSUMO:

BEAUVERIA BASSIANA, HONGO ENTOMOPATÓGENO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGAS CORTADORAS (YSAÚ)



Hernán Chiriboga P.
Graciela Gómez B.
Karla Garcés E.

Paraguay, 2015

Con la colaboración del





Productividad y sustentabilidad de la **agricultura familiar** para la seguridad alimentaria y economía rural

Qué es el IICA?

Hace más de 70 años, un grupo de visionarios identificó la necesidad de contar con un organismo especializado en agricultura para el continente americano, con un propósito que aún hoy mantiene vigencia: promover el desarrollo agrícola y el bienestar rural en ese continente.

Fue así como nació el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), que a lo largo de todo ese tiempo ha sido capaz de identificar retos y oportunidades, y lo más importante, de evolucionar como un organismo de cooperación técnica internacional que permanentemente responde a las nuevas demandas del sector agrícola.

La segunda década del siglo XXI ha traído nuevos desafíos y oportunidades para la agricultura de las Américas, destinada a convertirse en un verdadero motor de desarrollo, capaz de generar crecimiento económico y prosperidad para las poblaciones de esa región. Detonar el potencial del sector agrícola en nuestros países es crucial para resolver uno de los mayores retos de la humanidad: lograr la seguridad alimentaria.

El Instituto brinda su cooperación mediante el trabajo cotidiano, cercano y permanente con sus 34 Estados Miembros, cuyas necesidades atiende oportunamente, con el fin de lograr una agricultura cada vez más inclusiva, competitiva y sustentable. Sin duda alguna, el activo más valioso del IICA es la cercana relación que mantiene con los beneficiarios de su trabajo.

Desde nuestra fundación, hemos acumulado vasta experiencia en temas como tecnología e innovación para la agricultura, sanidad agropecuaria e inocuidad de alimentos, agronegocios, comercio agropecuario, desarrollo rural y capacitación.

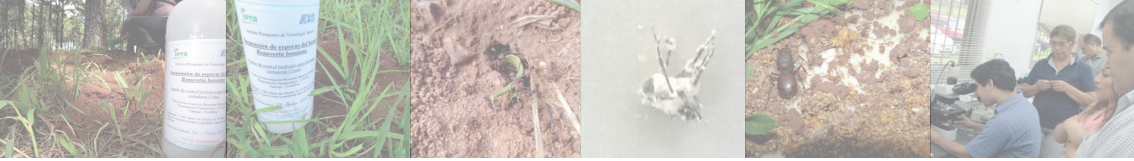
Por una agricultura competitiva y sustentable para las Américas

Nuestra **misión** es

“estimular, promover y apoyar los esfuerzos de los Estados Miembros para lograr su desarrollo agrícola y el bienestar rural por medio de la cooperación técnica internacional de excelencia”

Al lado de nuestros Estados Miembros, nuestra **visión** es

“alcanzar una agricultura interamericana competitiva, incluyente y sustentable que alimente el hemisferio y el mundo, y que a la vez genere oportunidades para disminuir el hambre y la pobreza en los productores y los habitantes de los territorios rurales”





Productividad y sustentabilidad
de la **agricultura familiar**
para la seguridad alimentaria
y economía rural

PROTOCOLOS PARA FORMULACIÓN Y APLICACIÓN DEL BIO-INSUMO:

Beauveria bassiana, HONGO ENTOMOPATÓGENO
PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGAS
CORTADORAS (YSAÚ)

Hernán Chiriboga P.
Graciela Gómez B.
Karla Garcés E.

Paraguay - 2015



Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 2015



Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (ysaú) por IICA se encuentra bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-Compartir igual 3.0 IGO (CC-BY-SA 3.0 IGO) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/igo/>)
Creado a partir de la obra en www.iica.int.

El Instituto promueve el uso justo de este documento. Se solicita que sea citado apropiadamente cuando corresponda.

Esta publicación también está disponible en formato electrónico (PDF) en el sitio web institucional en <http://www.iica.int>

Coordinación Editorial: Graciela Gómez
Corrección de estilo: Fernando Díaz
Diagramación: Orlando Giménez, IICA - Editora Ricor Gafic S.A.
Diseño de portada: Orlando Giménez, IICA - Editora Ricor Gafic S.A.
Impresión: Gráfica Latina S.A.

Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (ysaú) / IICA -- Asunción, Paraguay : IICA, 2015.
28 p.; 15cm x 19cm

ISBN: 978-92-9248-592-4

1. *Beauveria bassiana* 2. Control de plagas 3. Agentes de control biológico
4. Hongos entomopatógenos 5. Hongos 6. Formicidae 8. Lucha integrada I.
IICA II. Título

AGRIS
H01

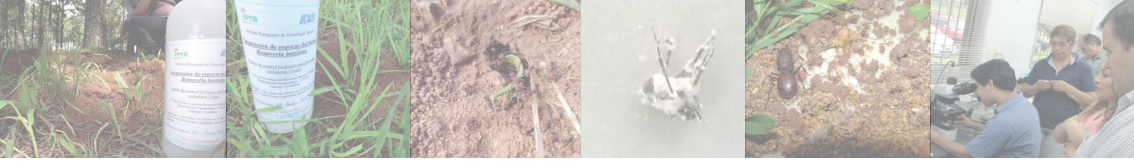
DEWEY
632.96



Productividad y sustentabilidad
de la **agricultura familiar**
para la seguridad alimentaria
y economía rural

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PRESENTACIÓN	
AGRADECIMIENTOS	
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	3
1. OBJETIVO.....	7
2. BENEFICIARIOS.....	7
3. VENTAJAS PARA EL PRODUCTOR	8
4. PROTOCOLO DE APLICACIÓN COMO RESULTADO DE INVESTIGACIÓN PARTICIPATIVA.....	9
4.1 INSTRUCCIONES DE USO DE LA SUSPENSIÓN DE <i>Beauveria bassiana</i>	10
4.2 PRECAUCIONES.....	11
4.3 MULTIPLICACION.....	11
PROTOCOLOS DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN Y DE FORMULACIÓN DEL BIOINSUMO.....	12
4.4 ESTRUCTURAS DEL HONGO <i>Beauveria bassiana</i> EN MICROSCOPIO.....	12
4.5 REACTIVACION DEL HONGO <i>Beauveria bassiana</i> EN LA PLAGA A CONTROLAR.....	13
4.6 CONSERVACIÓN DE HONGOS BENÉFICOS: BANCO PRIMARIO Y SECUNDARIO	14
4.7 CONCENTRACIÓN DE ESPORAS.....	15
4.8 GERMINACIÓN DE ESPORAS.....	18
4.9 PRUEBA DE PUREZA.....	19
4.10 PRUEBA DE PATOGENICIDAD	20
4.11 PRUEBAS FÍSICO – QUÍMICAS.....	21
5. LOGROS DE UNA COOPERACIÓN TÉCNICA	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	26





Productividad y sustentabilidad
de la **agricultura familiar**
para la seguridad alimentaria
y economía rural

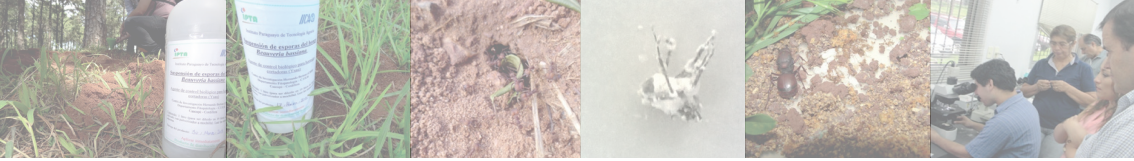
PRESENTACIÓN

La creciente demanda por productos limpios y orgánicos, generados por la conciencia cada vez más grande de la población local, regional e internacional hacia los alimentos inocuos; que cumplan con los protocolos de buenas prácticas agrícolas y que cuiden el ambiente, aparece como una alternativa viable ante las limitaciones crecientes que enfrenta el sector agrícola convencional, al emplear agrodefensivos para el control de plagas, a lo que se le suma la resistencia cada vez más grande de las plagas y enfermedades al control químico. Esto ha llevado a buscar nuevas herramientas para su control y prevención, particularmente en el ámbito de la Agricultura Familiar. Esta necesidad, ha motivado el uso de productos biológicos, amigables con el medio y eficaces en el control de enfermedades y plagas, constituyéndose los microorganismos como los más utilizados y aceptados por mostrar excelentes resultados en el campo.

Este documento, recoge los trabajos de investigación y aplicación de *Beauveria bassiana*, un hongo entomopatógeno que actúa como bio-insumo para el control de las hormigas cortadoras, que continúan siendo un serio problema entre los pequeños agricultores principalmente, por las pérdidas económicas y de cultivos que provocan. Se trata pues de presentar una alternativa biológica versátil que pueda usarse dentro de un plan de manejo integrado de plagas, constituyéndose como una de las mejores herramientas para una agricultura sustentable.

Los Autores

Ing. Hernán Chiriboga P., Representante del IICA en Paraguay
Ing. Agr. Graciela Gómez B., Especialista en Tecnología e Innovación del IICA
Biól. Karla Garcés, Consultora internacional en control biológico de plagas





Productividad y sustentabilidad
de la **agricultura familiar**
para la seguridad alimentaria
y economía rural

AGRADECIMIENTOS

Los autores hacen extenso el agradecimiento por la colaboración y apoyo en la elaboración y revisión del presente Manual a los siguientes profesionales:

Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA)

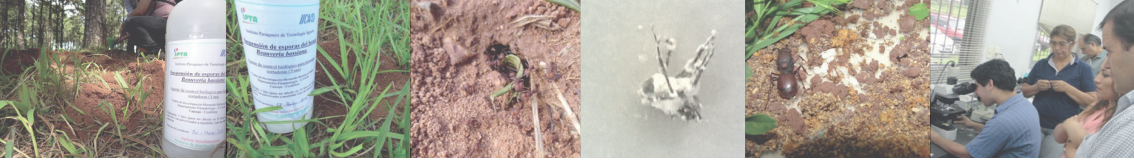
Ing. Agr. Gregorio Bozzano, Especialista en Fitopatología

Ing. Liliana Cabrera, Técnica en Fitopatología

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)

Ing. Agr. Fátima Almada, Especialista en Agricultura Familiar

Ing. Julian Andersen, Especialista en Recursos Naturales





INTRODUCCIÓN

El hongo *Beauveria bassiana* es considerado uno de los agentes de control biológico con mejor eficiencia en el sector agrícola. Existen experiencias de todas partes del mundo en el control exitoso de varios tipos de plagas, que causan daño y grandes pérdidas en el sector.

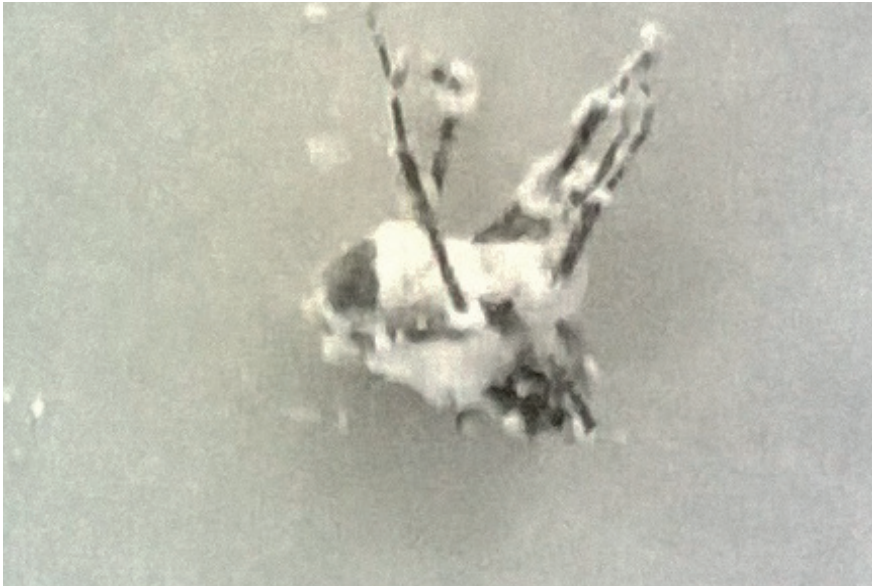


Hormigas cortadoras transportando a su nido restos vegetales para su alimentación.

El desafío local ha sido en el Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) desarrollar la producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, adaptado a las condiciones climáticas y de suelos del Paraguay con la cooperación del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), buscando así minimizar las pérdidas de productividad y la competitividad de la agricultura. Con la masificación del hongo, se pretendió facilitar el acceso de los productores de la Agricultura Familiar, a un bio-insumo eficaz para el control de las hormigas cortadoras que afectan sobre todo las fincas frutihortícolas de la Región Oriental



del país, aunque también las plantaciones forestales. De este modo también, se contribuye a expandir el modelo sustentable de producción agrícola familiar.



Hormiga cortadora atacada por el hongo *Beauveria bassiana*

Hay que tener en cuenta que cada vez se presentan mayores resistencias a productos agroquímicos por parte de las plagas y sumado a esto, los países a los cuales se exportan los productos aumentan las restricciones en el uso de numerosos plaguicidas, por cuanto demandan productos naturales u orgánicos, con certificación.

El uso masivo de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* producidos en sustratos naturales para el control de hormigas cortadoras del género *Atta spp.* tiene un gran potencial de disminuir la cantidad de plaguicidas químicas aplicadas en la agricultura. La multiplicación de *Beauveria bassiana* se puede realizar por los mismos agricultores, en unidades de producción muy sencillas en sus fincas utilizando arroz común como sustrato, y formulando solución con esporas del hongo para el control de hormigas cortadoras.



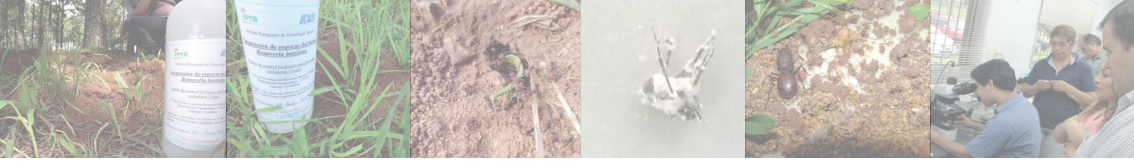
Productividad y sustentabilidad de la **agricultura familiar** para la seguridad alimentaria y economía rural

ANTECEDENTES

En concordancia con el Plan de Mediano Plazo 2014-2018 recientemente aprobado por los Ministros de Agricultura de las Américas, este proyecto se relaciona directamente con el Proyecto Insignia Hemisférico del IICA denominado: “Productividad y Sustentabilidad de la Agricultura Familiar para la Seguridad Alimentaria y Economía Rural”, para el logro del objetivo estratégico institucional que busca mejorar la contribución de la agricultura a la seguridad alimentaria y nutricional y la inclusión social.

En el Paraguay, la Agricultura Familiar se ha posicionado en los últimos años como un sujeto estratégico de las políticas públicas con miras a promover el desarrollo de los territorios rurales y del sector agro-rural. Por ello, el Marco Estratégico Agrario (MEA) Ampliado 2014- 2018 del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) - como política sectorial nacional - establece como uno de sus Ejes Estratégicos, el Desarrollo de la Agricultura Familiar y la Seguridad Alimentaria.

En este contexto, el MAG promueve y IPTA impulsa la identificación y multiplicación del hongo *Beauveria bassiana* y la producción de suspensión de conidios a ser usadas como inóculos para el control las hormigas cortadoras del género *Atta* spp., por los productores de la Agricultura Familiar del país, dado que en los últimos tiempos en Paraguay vienen destruyendo, cada vez con mayor agresividad, plantaciones completas de cultivos agrícolas de importancia económica, como ser: soja, algodón, trigo, maíz; además de aquellos destinados a la seguridad alimentaria como los fruti-hortícolas, mandioca, porotos; y plantaciones forestales varias como las de eucalipto, por ejemplo. Estas hormigas cortan las hojas y tejidos de las plantas y los transportan a sus nidos subterráneos; galerías en red muy amplia, donde los utilizan para el cultivo de un hongo basidiomiceto, que constituye su alimento principal.

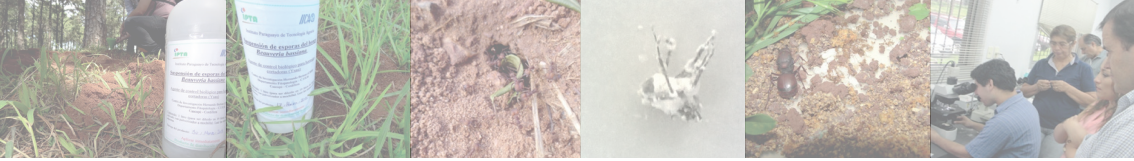


Se observa la hormiga reina, soldados y obreras que transportan el alimento para el basidiomiceto del que se alimenta la colonia de hormigas

Esta situación, ha generado alta preocupación en esferas públicas locales; referentes de la Agricultura Familiar, técnicos y productores, dado los daños y pérdidas causados por la plaga (hormigas cortadoras) en los cultivos de renta y de consumo. Es así que el MAG, a través del IPTA; solicitó la cooperación del IICA – Oficina en Paraguay, para fortalecer las correspondientes capacidades técnicas y laboratoriales, con miras a formular el protocolo de investigación adaptativa a seguir, para generar una solución tecnológica al ataque de tales hormigas cortadoras, centrada en buscar controladores biológicos de efecto masivo, como ser hongos de los géneros *Beauveria* que permitan el control natural de esta plaga agrícola.



Productores con ataque de hormigas cortadoras en sus fincas,
participan en jornada de capacitación sobre el uso de *Beauveria bassiana*





Productividad y sustentabilidad de la **agricultura familiar** para la seguridad alimentaria y economía rural

PROTOSCOLOS PARA FORMULACIÓN Y APLICACIÓN DEL BIO-INSUMO: *Beauveria bassiana*, HONGO ENTOMOPATÓGENO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGAS CORTADORAS (YSAÚ)

1. OBJETIVO

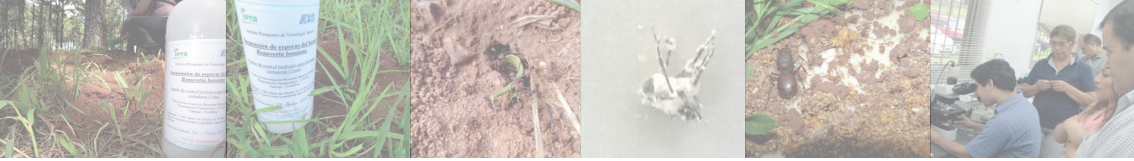
Fortalecer las capacidades nacionales para controlar hormigas cortadoras mediante la formulación, producción y aplicación de un producto base, al cual se incorporan conidios de hongos del género *Beauveria* con efecto biológico masivo y letal contra el hongo simbiótico cultivado por las hormigas cortadoras del género *Atta spp.*, que posibilite incrementar la productividad y la competitividad de la agricultura, así como la producción de alimentos básicos inocuos y de alta calidad nutricional.

2. BENEFICIARIOS

Los beneficiarios de este proyecto son: El laboratorio de Fitopatología del IPTA; los técnicos investigadores del IPTA, los técnicos de Asistencia Técnica del MAG/DEAg y del Instituto Forestal Nacional (INFONA); también los del Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE); técnicos de empresa privadas (BIO EXPORT S.A.); además de los productores líderes que componen el sector de la Agricultura Familiar.



Curso laboratorio sobre el hongo.



3. VENTAJAS PARA EL PRODUCTOR

Los hongos como *Beauveria bassiana* que pueden causar enfermedades en los insectos, son llamados entomopatógenos. Viven naturalmente en el ambiente, suelos o en agua, como así también alojados en los mismos cuerpos de los insectos, causando su muerte en un plazo aproximado de cinco a siete días; con la posibilidad de propagar la enfermedad a otros insectos bajo condiciones favorables de temperatura y humedad.

- » Los entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, se multiplican y dispersan dentro del mismo cultivo favoreciendo la acción reguladora de la población de insectos-plaga.
- » Éstos permanecen en el área en insectos vivos invernantes; en sus restos o en el suelo; y pueden ser transmitidos de una generación a otra del insecto, por contaminación de los desoves e infección de las crías recién nacidas.
- » Los microorganismos pueden ocasionar no sólo la muerte directa de los insectos, en este caso hormigas cortadoras, sino también la disminución de la oviposición; viabilidad de los desoves o aumentar la sensibilidad a otros agentes de control.
- » Una vez establecido el entomopatógeno en el área, mantiene la población de la plaga por debajo de los niveles de daño económico.
- » Los entomopatógenos no contaminan el ambiente y no son tóxicos para el hombre y otros animales.
- » La aparición de resistencia en los insectos hacia los patógenos es extremadamente baja, comparada con la alta probabilidad de adquirirla, si se usaran agroquímicos.



Productividad y sustentabilidad de la **agricultura familiar** para la seguridad alimentaria y economía rural



Agricultores y técnicos en jornada de capacitación sobre aplicación de *Beauveria bassiana* en minas de hormigas cortadoras en finca de productor.

4. PROTOCOLO DE APLICACIÓN COMO RESULTADO DE INVESTIGACIÓN PARTICIPATIVA

El producto que se observa en la foto, es una solución que contiene esporas de *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno utilizado para el control de poblaciones de insectos plaga a nivel agrícola.





4.12. INSTRUCCIONES DE USO DE LA SUSPENSIÓN DE *Beauveria bassiana*

- Agitar la solución conteniendo la suspensión de esporas de *Beauveria bassiana* antes de utilizarla.
- Preparar 500 ml. del producto en 9 litros de agua; o bien 1 litro de suspensión de *Beauveria bassiana* por cada 19 litros de agua limpia.
- Mezclar con suavidad.
- Una vez preparada la mezcla aplicar inmediatamente, en media hectárea de cultivo.
- Aplicar en los cultivos para el control de hormigas cortadoras; en aspersión con bomba de mochila o regadera, dirigida al hormiguero o mina y camino de las hormigas. También en aplicación foliar dirigida a las plantas y hojas de preferencia de las hormigas, en cualquier etapa del cultivo.



Se recomienda agregar 1 litro de la suspensión de *Beauveria bassiana* por cada 19 litros de agua, en un balde



Aplicación del preparado de *Beauveria bassiana*



Productividad y sustentabilidad
de la **agricultura familiar**
para la seguridad alimentaria
y economía rural

4.13. PRECAUCIONES

- Es recomendable aplicar en horas de la mañana antes de las 10:00 o en la tarde después de las 16:00 horas, porque las elevadas temperaturas y los rayos ultravioletas pueden dañar la población del hongo.
- Evitar aplicar con otros químicos como fungicidas o insecticidas, debido a que se pueden afectar las poblaciones del hongo, así como cuidar que los recipientes empleados no hayan sido empleados con fungicidas.
- Aplicar el preparado con equipo de protección (guantes, tapa boca, anteojos, etc.).
- El producto no puede ser almacenado sino por pocos días, debido a que el hongo es un ser vivo; por ello su aplicación debe ser lo más rápida posible luego de su preparación, a fin de asegurar su eficacia.
- Utilizar para la mezcla, agua limpia con un pH entre 5,2 y 6,5; sin desinfectantes.
- Es conveniente para la germinación de las esporas del hongo, que exista humedad en el suelo, luego de la aplicación de *Beauveria bassiana*.
- El equipo de aplicación (mochila u otro), debe estar libre de residuos de insumos químicos.
- El producto tiene una vida útil de ocho (8) días después de su fecha de elaboración.
- Se debe almacenar en un lugar fresco y seco; de preferencia refrigerada, y fuera del alcance de los niños.

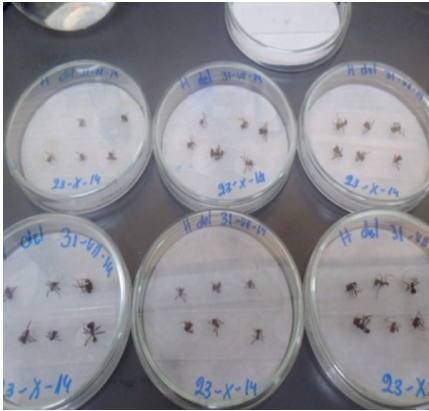
Beauveria bassiana causa efectos permanentes en las poblaciones de insectos plaga de importancia económica. Infecta a más de 200 especies de insectos, entre los que se destacan hormigas, gusanos, áfidos, ácaros y escarabajos.

4.14. MULTIPLICACION

Para la multiplicación del hongo se necesita como sustrato de cultivo un cereal como el arroz. El hongo posee crecimiento de color blanco característico. Al cabo



de 15 días, se realiza la extracción de esporas del hongo que se encuentran en el arroz, utilizando agua con pH adecuado, ajustando una concentración de 1×10^8 esporas por ml. de suspensión, la que debe ser diluida en agua limpia, para la aplicación a campo.



En el laboratorio, la multiplicación del hongo se realiza en placas con el sustrato adecuado



La multiplicación de *Beauveria bassiana* se realiza utilizando arroz común esterilizado como sustrato en bolsitas de plástico

PROTOCOLOS DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN Y DE FORMULACIÓN DEL BIOINSUMO

Se describen protocolos de trabajo de investigación para su uso por parte de los técnicos laborales.

4.15. ESTRUCTURAS DEL HONGO *BEAUVERIA BASSIANA* EN MICROSCOPIO

Realizar las placas para observar al microscopio.

Tomar con una cinta adhesiva el hongo crecido sobre el medio de cultivo; pegarlo sobre una placa portaobjetos y observar al microscopio.

Tener en cuenta las características de la colonia, en el plato Petri.



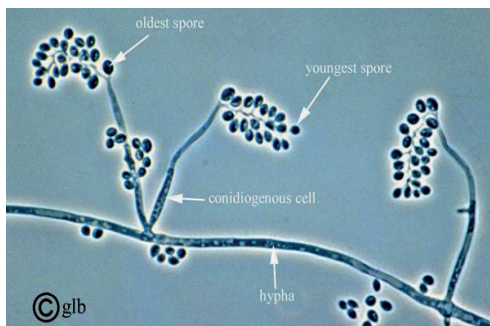
Productividad y sustentabilidad de la **agricultura familiar** para la seguridad alimentaria y economía rural

Descripción morfológica de la colonia:

Es un hongo deuteromicete que en medio de cultivo específico (PDA), crece formando una estructura algodonosa y polvosa de color blanco conocida como muscardina blanca. Cuando la colonia va envejeciendo se vuelve crema amarillenta. El revés es de color rojizo en el centro cuando está en crecimiento y amarillo alrededor.

Descripción microscópica:

Micelio septado, conidióforos de 1 a 2 micras de diámetro, de donde nacen conidios o esporas hialinas redondas y ovaladas de 2 a 3 micras de diámetro, que se insertan en el raquis.



Observación Micelio septado, conidióforos, esporas

4.16. REACTIVACION DEL HONGO *BEAUVERIA BASSIANA* EN LA PLAGA A CONTROLAR

Se seleccionan insectos activos, que se encuentren vivos al momento de ser recolectados, no importa si mueren cuando llegan al laboratorio.

Desinfectar los insectos con hipoclorito de sodio al 0,5%. Los insectos se sumergen dependiendo de la especie de 2 a 10 minutos. Se retira el exceso de hipoclorito sobre una toalla de papel estéril; se procede a lavar tres (3) veces en agua destilada estéril y se retira el exceso en toalla de papel estéril.

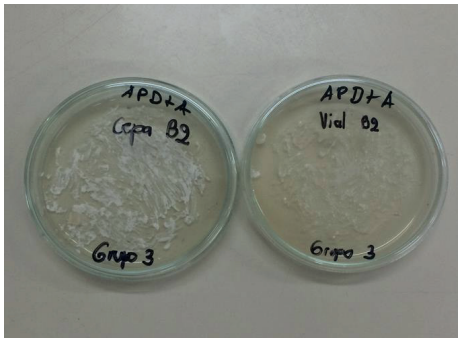
La infección de los insectos se realiza por inmersión durante dos (2) minutos en 10 ml. de suspensión de esporas de *Beauveria bassiana*. Sin retirar el exceso, se



colocan los insectos en una placa de Petri dentro de una cámara húmeda, a la cual se le debe hacer controles diarios para mantener la humedad.

Después de 10 a 15 días, cuando el hongo se ha desarrollado por completo, se toman los insectos con una pinza y se realiza una desinfección en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por un minuto. Sin lavar, se pasan a una toalla de papel para retirar el exceso de hipoclorito.

Finalmente los insectos colonizados y desinfectados, se pasan a cajas o tubos inclinados con agar PDA y se realiza la conservación de la cepa. Ésta cepa servirá para futuras masificaciones.



Crecimiento de *Beauveria bassiana* en PDA



Resultados de pruebas de reactivación de *Beauveria bassiana* sobre hormigas cortadoras

4.17. CONSERVACIÓN DE HONGOS BENÉFICOS: BANCO PRIMARIO Y SECUDARIO

Realizar la preparación de azul de lactofenol para comprobar la pureza del hongo benéfico.

Colocar en los tubos Eppendor 1 ml. de aceite mineral y autoclavar.

A partir de la caja con crecimiento del hongo benéfico, obtener una muestra utilizando un sacabocados, de tal manera que se obtenga un disco de 5 mm. de diámetro que contiene un fragmento de agar y el hongo benéfico.



Bajo condiciones de esterilidad, destapar el tubo Eppendor y depositar dentro, el disco de agar conteniendo hongo; taparlo y guardarlo bajo congelación.

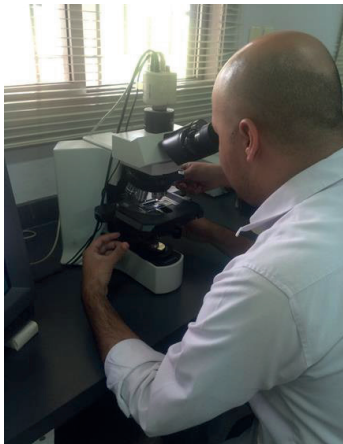
Para el banco primario, es necesario guardar por lo menos 50 viales de cada hongo.

El banco secundario de hongo se obtiene a partir del banco primario, reconstituyendo un disco en agar PDA. Una vez obtenido el crecimiento del hongo, repetir el procedimiento desde el paso tres (3). Se debe almacenar por lo menos 150 viales de cada hongo como banco secundario.

4.18. CONCENTRACIÓN DE ESPORAS

Se realiza la cosecha de esporas de los tubos por raspado con la ayuda de una varilla de vidrio o aguja de disección en una licuadora, adicionando una solución estéril de agua destilada con Tween 80 al 0,1%, hasta un volumen conocido (1.000ml.); ésta es la suspensión madre.

Se preparan diluciones en base 10, a partir de la solución madre; puede ser hasta 10^{-4} o 10^{-5} . Para el recuento de esporas y tener la concentración del inóculo formulado, se utiliza la cámara de Neubauer o hemocitometro.



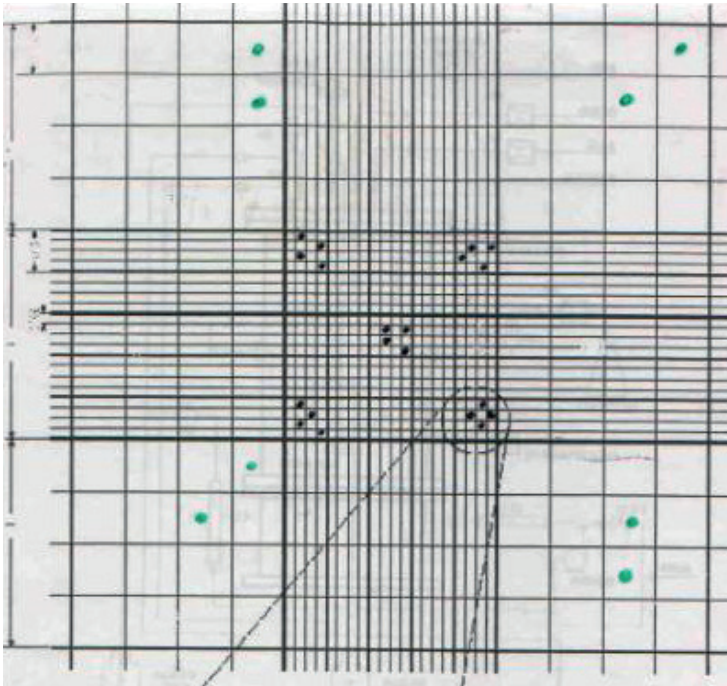
Recuento de esporas de *Beauveria bassiana* en Cámara de Neubauer



La cámara está dividida en dos (2) retículos y cada uno se subdivide en nueve (9) cuadros de 1 mm² cada uno, de manera que cada retículo tiene una superficie total de 9 mm². El cuadro central aparece de nuevo subdividido en 25 cuadrantes y estos en 16 cuadrantes más pequeños.

El recuento se determina sumando el total de esporas presente en los 25 cuadrantes centrales de la cámara.

La concentración de esporas, se calcula multiplicando el recuento aproximado de esporas por el inverso de la dilución empleada para el conteo y por el inverso del factor de la cámara.





Productividad y sustentabilidad de la **agricultura familiar** para la seguridad alimentaria y economía rural

FACTOR DE LA CÁMARA DE NEUBAUER

Volumen = ancho x largo x profundidad

Volumen = 1 mm x 1 mm x 0.1 mm

Volumen = 0.1 mm³ (volumen del cuadrante en el cual se realiza el conteo de esporas)

El número de esporas se obtiene en ml. por lo tanto, se debe realizar la conversión de mm³ a , ul entonces:

$$\begin{array}{rclcl}
 1 \text{ ml} & \text{---} & 10^3 \text{ mm}^3 & & 1 \text{ ml} \times 0.1 \text{ mm}^3 & & 0.1 \text{ ml} \\
 \times & \text{---} & 0.1 \text{ mm}^3 \times 10^3 \text{ mm}^3 & & = 10^3 & & = 0.1 \times 10^3 \\
 \times & = & 10^{-1} \times 10^{-3} & = & 10^4 \text{ ul (factor de la cámara)} & &
 \end{array}$$

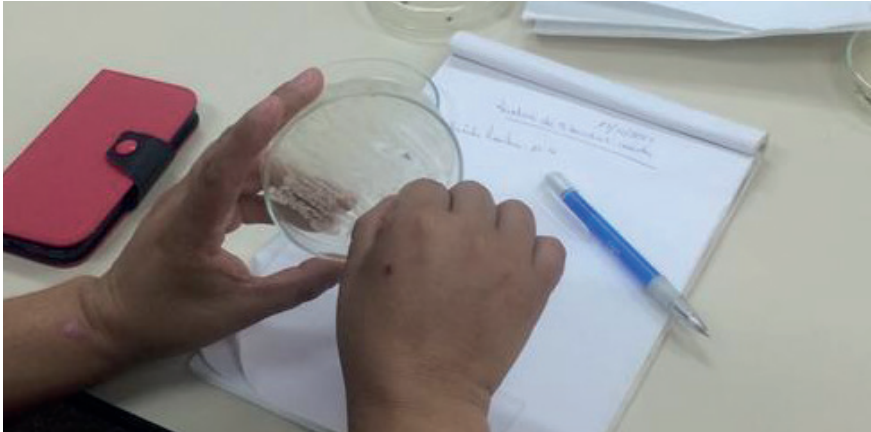
Si N es el número promedio de esporas por cuadrante, entonces la concentración que se desea conocer, denominada C, se estima de la siguiente manera:

$C = N \times \text{dilución empleada} \times \text{factor de la cámara.}$

Antes de proceder al recuento de esporas, la cámara de Neubauer debe ser lavada y secada. El tubo de la dilución de la muestra de la cual se va a hacer el conteo de esporas, se agita vigorosamente e inmediatamente se toma la muestra de 10 ul (0.01ml) con una micro pipeta y se deposita con cuidado, de manera que el líquido entre por capilaridad sin que se formen burbujas en la cámara. Si esto ocurre, se retira el cubreobjetos; se lava, se seca la cámara y se repite el proceso.

En cada compartimiento de la cámara se depositan 0.01 ml de la dilución que facilita el recuento de 10 a 50 esporas por cuadrante. Se lleva la cámara al microscopio con el objetivo de 10X; se localiza el campo visual. Cuando esté enfocado nítidamente, se pasa al objetivo de 40X y se procede a realizar el recuento.

Para el cálculo del número de esporas por gramo, se debe determinar previamente el peso del sustrato (arroz) utilizado para el cultivo del hongo.



Preparación de placas para la observación de estructuras de *Beauveria bassiana* al microscopio.

4.19. GERMINACIÓN DE ESPORAS

Esta prueba de germinación junto con el recuento de esporas, determina la viabilidad de las esporas de un producto biológico.

Preparar cajas de agar agua o agar PDA; marcar cinco (5) puntos en la superficie externa inferior de la caja correspondientes a los puntos en los cuales se depositarán las alícuotas que contienen las esporas.

De la dilución donde se realizó el recuento de esporas en la prueba anterior, previamente agitada, se toman 0,05 ml para depositar en las cajas Petri, a razón de cinco (5) alícuotas por caja por dilución. Las cajas se deben incubar a 25 grados centígrados (+ o - 2) durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agrega una gota de azul de lactofenol a cada alícuota, con el propósito de detener la germinación y a la vez teñir las esporas del hongo. Luego con la ayuda de un bisturí, se cortan las alícuotas depositándolas sobre una lámina portaobjetos y se cubren con una laminilla.

La observación se hace con el objetivo 40X contando un mínimo de 100 esporas



(germinadas y no germinadas) por alícuota. Con los datos obtenidos se calcula el porcentaje de germinación.

Una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. Esto debido a que cuando se realiza la aplicación en campo, el hongo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto que está controlando y un corto periodo de exposición a condiciones ambientales. Esta formulación es de aplicación inmediata, su eficacia de control es buena hasta 48 horas de formulado y conservado a 5°C de temperatura hasta el momento de aplicación.

4.20. PRUEBA DE PUREZA

Con esta prueba, se determina la proporción del agente biológico en la formulación y se identifican los microorganismos contaminadores, contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos. Es posible tener hasta un 10% de contaminantes.

Preparar cajas de agar PDA con antibiótico.

De las diluciones preparadas para las pruebas de recuento y germinación se agitan y se inoculan 0,1 ml en la superficie del agar PDA. Se puede trabajar con las diluciones donde se obtuvieron los recuentos. Se realiza esta prueba por duplicado. Se dispersa el inóculo sobre el agar con ayuda de un rastrillo o pipeta esterilizada

Se incuban las cajas a 25 grados (+ o -2) con el fin de promover el desarrollo de las colonias.

Diariamente y durante cinco (5) días, se contabiliza el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada microorganismo obtenido en cada una de las diluciones sembradas. Al final de las lecturas, se identifican los microorganismos contaminantes; se anota el número de UFC estimado; el porcentaje del hongo entomopatógeno en estudio y los microorganismos contaminantes.

El porcentaje de pureza se calcula así:

$$\% \text{Pureza} = \frac{\text{Unidades formadoras de colonias del hongo evaluado}}{\text{Unidades formadoras de colonias totales}} \times 100$$

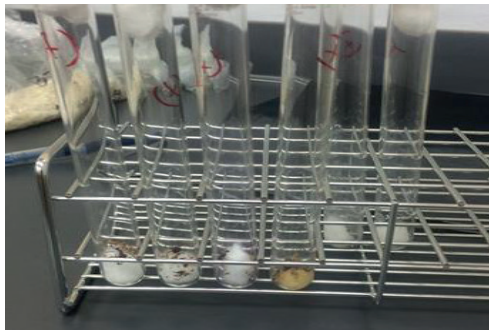


4.21. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Esta prueba determina si el hongo entomopatógeno ataca a la plaga para la cual está recomendado. Sin embargo no asegura que bajo condiciones de campo, su eficacia va a ser igual a la registrada en el laboratorio. Esta prueba requiere que se críen y se manipulen los insectos en el laboratorio, para asegurar que los testigos sigan vivos durante la prueba. Los ensayos se diseñan para proporcionar condiciones ideales en el momento de la exposición al patógeno; para que ocurra la germinación e invasión del hospedante y en la conidiogénesis, para favorecer la esporulación del hongo sobre el insecto muerto y poder confirmar que la mortalidad se debió al tratamiento con el hongo evaluado.

Se seleccionan adultos de los insectos a ser evaluados, que deben estar vivos y activos; libres de enfermedades. Se desinfectan con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante dos (2) a diez (10) minutos dependiendo del insecto y se lavan con agua destilada estéril. Después de este lavado, se seleccionan los insectos que se encuentren más activos.

Se prepara una concentración de esporas del hongo entomopatógeno de 1×10^{-7} suspendidas en agua destilada estéril. Se toman varios insectos con tres (3) repeticiones y un testigo con la misma cantidad de insectos que no entran en contacto con el hongo.



Prueba de patogenicidad

Se sumergen los insectos en la suspensión de esporas del hongo durante dos (2) minutos, la cual se mantiene en agitación manual. Luego se coloca un insecto en un tubo



estéril con un disco de papel de toalla o algodón, previamente humedecido con agua destilada estéril y se tapa el tubo con una mota de algodón esterilizada bien ajustada a la boca del mismo. Después de 24 horas se adiciona alimento para cada insecto.

Diariamente y durante 10 días se evalúa la mortalidad causada por el hongo en estudio, observando al estereoscopio los síntomas y signos de enfermedad en los insectos. Los insectos vivos o muertos deben permanecer en los tubos para que no se interrumpa el desarrollo normal del hongo en el insecto. Diariamente con la ayuda de una jeringa desechable, se adiciona agua destilada estéril para humedecer el algodón, evitando la presencia de agua libre. La humedad puede ser considerada como el factor más importante en el desarrollo de una micosis, en las etapas de germinación de las esporas y conidiogénesis.

Con el registro diario de patogenicidad, se establece el ciclo de desarrollo del hongo sobre el insecto; el porcentaje de mortalidad y el promedio del tiempo de mortalidad.

El tiempo de evaluación varía para cada hongo entomopatógeno estudiado, dependiendo del ciclo biológico del hongo en el insecto y de la supervivencia del insecto no inoculado bajo las condiciones del ensayo. Los productos comerciales deben causar mortalidades superiores al 80% en esta prueba.

4.22. PRUEBAS FÍSICO – QUÍMICAS

4.11.1 pH

Mediante esta prueba, se determina la acidez o alcalinidad de una formulación. Se prepara una mezcla en proporción 1:10 (muestra: agua destilada); se homogeniza y se deja reposar durante una hora.

Con un potenciómetro previamente calibrado, se determina el pH. El valor del pH influye en la germinación del hongo retardándola en valores extremos. Se consideran intervalos óptimos de pH los valores entre 5,5 y 7.

4.11.2 HUMECTABILIDAD

Determina el tiempo que tarda un polvo mojable en humedecerse completamente. Se pesan 5 g de la formulación que se va a evaluar y se depositan en un punto fijo en la superficie de un vaso de precipitado de 250 ml, que contiene 200 ml de agua destilada.



Con un cronómetro, se mide el tiempo transcurrido entre el momento de agregar la muestra y el instante en el que ésta desaparece de la superficie. Esta prueba solo se realiza a productos comerciales formulados en polvo; talcos, bentonitas, tierra de diatomeas, leche, entre otros.

4.11.3 SUSPENSIBILIDAD

Determina la concentración de esporas del producto en suspensión después de un tiempo de preparada la mezcla, con el fin de asegurar su homogeneidad durante la aplicación.

Se utiliza un hongo producido sobre arroz de 15 a 20 días de incubación. Con este hongo se prepara una suspensión, adicionando a una bolsa o botella de 100 g de arroz con crecimiento de hongo, 10 ml de aceite agrícola y un poco de agua destilada estéril, removiendo las esporas con ayuda de una espátula.



Masificación de *Beauveria bassiana* en sustrato de arroz

Se vierte la suspensión en un Erlenmeyer y se completa hasta un (1) litro, adicionando agua destilada estéril, siendo esta la suspensión madre.

De la suspensión madre se toman 50 ml y se llevan a un volumen total de un litro, conservando la relación gramo de producto formulado por volumen de agua recomendado (ejemplo: 100 gramos de arroz con hongo en 20 litros de agua para aplicar en el campo).



Se agita el volumen total de la suspensión de esporas; se filtra a través de una malla o colador de red pequeña que permita solamente el paso de las esporas del hongo y elimine los residuos de arroz. Se agita la muestra; se toma 1 ml y se lleva a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril, realizando las diluciones respectivas. Se cuentan las esporas en la cámara de Neubauer y se calcula la concentración inicial de esporas por ml en el volumen total de la suspensión.

El volumen restante de la suspensión, se distribuye en cuatro (4) probetas de 250 ml agitando previamente. Se dejan en reposo en un sitio que no esté sometido a vibraciones o movimientos que alteren el proceso de sedimentación normal de las esporas

Al cabo de 50 minutos, se introduce lentamente a cada una de las probetas, una pipeta de 10 ml cuya punta penetre unos 15 cm. desde la graduación superior de la probeta. De este sitio se toman 10 ml de la suspensión de esporas y se depositan en tubos de vidrio.

A partir de estas suspensiones se preparan las diluciones que permitan el conteo de esporas, preferiblemente en la cual se efectuó el conteo inicial, se realiza el recuento en la cámara de Neubauer en las cuatro probetas y se saca el promedio.

EJEMPLO:

$$\% \text{ DE SUSPENSIBILIDAD (\%S)} = CF \times 100 / CI$$

DONDE:

CF: Concentración final

CI: Concentración inicial

$$\%S = \frac{6,5 \times 10^{-9}}{4,4 \times 10^{-9}} \times 100 = \%S 67,7$$

67,7% es el porcentaje de esporas suspendidas al cabo de 50 minutos, lo que corresponde al tiempo que se demora un aspersor de 10 litros para evacuar su contenido con una boquilla de 190 CC/min. de descarga.



5. LOGROS DE UNA COOPERACIÓN TÉCNICA

El Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación del IPTA formula y produce preparados para el control biológico de hormigas cortadoras, a base de hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, merced a una solicitud de Cooperación Técnica del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) al IICA Paraguay, mediante:

- a. La capacitación laboratorial de 15 técnicos del IPTA, y del Sistema MAG, que posibilitó incrementar la formación de capacidades técnicas (40) de los sectores público y privado para asegurar la sanidad agropecuaria y la inocuidad de los alimentos y mejorar - de esa manera - la productividad, la competitividad y la seguridad alimentaria.
- b. La adecuación de un Laboratorio del Centro de Investigación “Hernando Bertoni” del IPTA, con las condiciones requeridas para la producción de productos o preparados para el control biológico de hormigas cortadoras a base del hongo fitófago; provee del bio-insumo (Bio-Plaguicida) a pequeños productores hortícolas y agentes de asistencia de instituciones públicas y privadas, para su uso en parcelas demostrativas; y conforme a resultados de eficacia será una innovación tecnológica adoptada por la Agricultura Familiar para el control biológico de hormigas cortadoras, orientados a incrementar la productividad y la competitividad de la agricultura, así como la producción de alimentos básicos de alta calidad nutricional.
- c. Socializar en forma directa con 40 técnicos protocolos para la formulación del bio-insumo a base del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y protocolo de su aplicación con alrededor de 300 productores, para el control biológico de hormigas cortadoras (Ysaú).



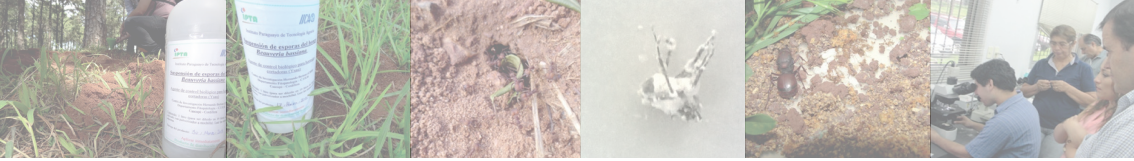
Productividad y sustentabilidad de la **agricultura familiar** para la seguridad alimentaria y economía rural



Técnicos del IPTA, del Sistema MAG y del sector privado capacitados



Técnicos de sectores públicos y privados así como productores líderes capacitados en formulación y aplicación de Bioinsumo para control de hormigas cortadoras.



6. BIBLIOGRAFÍA

GARCES ENCALADA, K. Masificación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control de hormigas cortadoras. Asunción, Paraguay. IICA. 2014. 21p. (Informe)

GARCES ENCALADA, K. Producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, para el control de hormigas cortadoras. Caacupé, Paraguay. Centro de Investigación Hernando Bertoni. 2014.

BOZZANO, G.; CABRERA, L. Avances de los trabajos con *Beauveria* sp. para el control de hormigas cortadoras. Asunción, Paraguay. 2014. 3p. (Informe)

DUARTE, Z.; BOZZANO, G.; GARCES ENCALADA, K. Control biológico de plagas y enfermedades. Caacupé, Paraguay. Centro de Investigación Hernando Bertoni. 2014. (Capacitación)





INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA

Oficina en Paraguay

Gral. Patricio Escobar casi Ruta Mcal. Estigarribia

Campus Universitario de la Universidad Nacional de Asunción

San Lorenzo, Paraguay

Telefax.: (595-21) 584 060

Correo Electrónico: iica.py@iica.int / Sitio Web: www.iica.int/Paraguay

IICA

