

Caracterización Biológica de Entomófagos

Comportamiento de Forrajeo

C. Rincón López, J. García González, A. López-Ávila. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas -MIP- Corpoica, Centro de Investigación Tibaitatá, Apartado Aéreo 240142 Las Palmas. Santafé de Bogotá, D.C. Colombia E-mail: mip@corpoica.org.co

Introducción

El estudio del comportamiento de insectos parasitoides y depredadores es tema de investigación desde los años de 1930, cuando autores como Tinbergen, Salt, Uilyett y Thorpe iniciaron este tipo de trabajos (Alphen y Jervis, 1996). A partir de esa época el conocimiento del comportamiento de los insectos entomófagos se ha incrementado gracias a la importancia de estos organismos como agentes de control biológico, en programas de manejo de plagas, a los avances tecnológicos y al rigor analítico en la generación de la información y la incorporación de modelos matemáticos a su estudio (Alphen y Jervis, 1996).

La determinación de las características biológicas intrínsecas de parasitoides y depredadores es fundamental en la comprensión del comportamiento de estos agentes de control frente a las poblaciones de sus hospederos o presas. Este conocimiento permite determinar el nivel de acción del enemigo natural y predecir el éxito o fracaso de un programa de control biológico. Las características más sobresalientes estudiadas y están relacionadas con: las estrategias de localización y selección del hospedero o presa; los patrones de búsqueda del entomófago en un área determinada; la fecundidad; el comportamiento alimenticio; la variación en la tasa de ataque por efecto de la densidad de la presa u hospedero, por la presencia de otros parasitoides o depredadores buscando en la misma área, o por el patron de distribución de la plaga (Alphen y Jervis, 1996).

Objetivo general

Conocer aspectos básicos de diseño, montaje, evaluación y análisis de pruebas orientadas a la determinación de las características biológicas intrínsecas y algunos parámetros de eficiencia de los insectos entomófagos.

1. Efecto de la densidad de hospederos en la actividad de forrajeo del parasitoide *Trichogramma lopezandinensis* Sarmiento (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

El término «forrajeo» se aplica en ecología y etología a todas las actividades que realiza un individuo en relación con la obtención de su alimento. En el caso particular de los parasitoides

de huevos, las actividades relacionadas con la parasitación de hospederos se incluyen generalmente dentro de este término, dado que las relaciones tróficas que se establecen en la interacción hospedero-parasitoide, mas allá de las actividades puramente reproductivas, permiten la ampliación de este concepto.

La actividad de forrajeo de los parasitoides, esta orientada por diferentes factores, como son las señales de tipo químico emitidas por el hospedero, las cuales se dan mediante la producción de compuestos conocidos como kairomonas. La concentración de kairomonas esta determinada directamente por la densidad de individuos del hospedero.

Concentraciones altas de kairomonas facilitan la localización del hospedero y generan el denominado «efecto de arresto» sobre el parasitoide. Este efecto consiste en el incremento del tiempo de permanencia del parasitoide en un parche de hospederos, lo cual teóricamente incrementa la actividad parasítica. Es más probable que una mayor proporción de hospederos del parche sea parasitada, si el parasitoide permanece en el área durante un período de tiempo prolongado.

El comportamiento de agregación de los parasitoides, se evidencia como una concentración de los individuos que forrajean en una misma área de búsqueda, sobre los parches de mayor densidad de hospederos. La agregación, por consiguiente, es un resultado de la concentración de kairomonas.

El comportamiento de forrajeo de un parasitoide define, en gran parte, el éxito reproductivo de la población en un hábitat particular. Este comportamiento esta determinado por la afinidad de la interacción que se establece entre el parasitoide y el hospedero. Mejores interacciones permiten un mayor rendimiento reproductivo, como resultado de una actividad de forrajeo más eficiente. Por lo tanto el estudio de esta área del comportamiento, es una herramienta fundamental para inferir acerca de esta interacción y por ende, de la eficiencia de un parasitoide como agente potencial de control biológico de un hospedero determinado.

Objetivos

- Reconocer el efecto de la densidad de hospederos, *Tecia solanivora* Povolny (Lepidóptera: Gelechiidae) y por consiguiente de la concentración de kairomonas, sobre el patrón de búsqueda del parasitoide *Trichogramma lopezandinensis*, durante el forrajeo.
- Describir la distribución espacial de las hembras de *Trichogramma lopezandinensis* en actividad de forrajeo, sobre una población del hospedero, en relación con la concentración de kairomonas

Materiales

Equipos de disección

Instrumental entomológico corriente: pinzas, pinceles, estereoscopio

Cajas de petri plásticas transparentes de 10 cm de diámetro
Papel toalla y filtro
Cronómetros o timers
Hembras de *Trichogramma lopezandinensis*
Huevos del hospedero *Tecia solanivora*

Metodología

Experimento N°1. Determinación del patrón de búsqueda individual de *T. lopezandinensis*

La Figura 1 muestra el diseño propuesto para este experimento. Se utilizarán parches con densidades de cuatro, ocho, 16 y 32 huevos del hospedero *Tecia solanivora* de un día de edad. La distribución de los parches se realizará en un arreglo de bloques completos al azar, con cuatro replicaciones ubicados a 3, 6, 9 y 12 cm del lugar de liberación del parasitoide. Se liberará una hembra de *T. lopezandinensis* por arena. Las hembras tendrán 24 horas de emergidas y se les habrá permitido copular libremente. Debido a que se ha determinado que la experiencia puede influir en el comportamiento de una hembra, puesto que el contacto el hospedero previo con las kairomonas y la experiencia de oviposición sobre el hospedero, incrementan su eficiencia parasítica, las hembras someterán a una experiencia de oviposición previa sobre el hospedero en estudio, por un periodo de media hora.

Se realizará un seguimiento y registro del recorrido de la hembra en la arena experimental. Se contabilizará el tiempo de permanencia de la avispa en cada parche de huevos. La duración total del experimento será de una hora. Los resultados se someterán a un análisis de varianza.

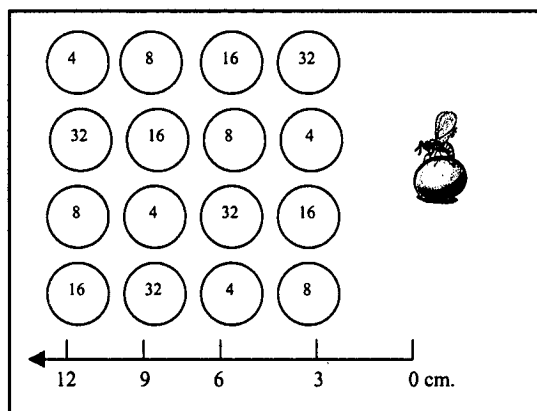


Figura 1. Representación esquemática de un experimento diseñado para el estudio del efecto de la densidad de hospederos sobre el forrajeo de *Trichogramma lopezandinensis* (Alphen & Jervis 1996)

Diseño general del experimento 1:

Tratamientos	Densidades de hospederos: 4, 8, 16 y 32
Bloques	Distancia al lugar de liberación: 3, 6, 9, 12 cm
Variables	Recorrido de las hembras, tiempo de permanencia en cada parche
Resultados	Efecto de tratamientos (densidad de hospederos) y bloques (distancia de liberación) sobre las variables (recorrido y tiempo de permanencia). Análisis de varianza

Experimento N° 2. Determinación del patrón de búsqueda en grupo de *Trichogramma lopezandinensis*

La Figura 2 muestra el diseño propuesto para este experimento, similar al experimento 1. Se liberarán ocho hembras por arena. Se registrará como un evento el encuentro de tres o más hembras sobre un mismo parche de huevos y el tiempo de permanencia del grupo allí. Con base en esta información se establecerá el tipo de distribución espacial de las hembras durante el forrajeo (agregada o aleatoria).

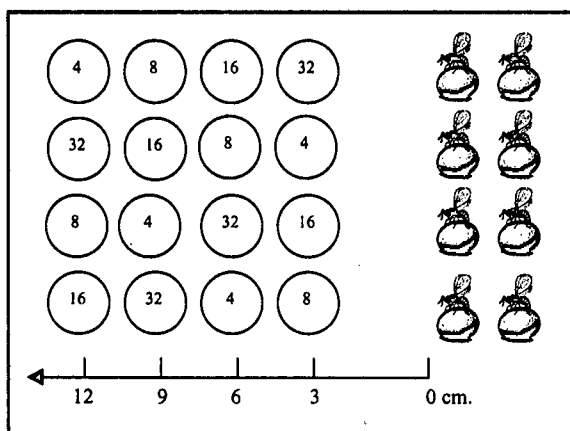


Figura 2. Representación esquemática de un experimento diseñado para el estudio de la respuesta de agregación de *Trichogramma lopezandinensis*.

Diseño general del experimento 2:

Tratamientos	Densidades de hospederos: 4, 8, 16 y 32
Bloques	Distancia al lugar de liberación: 3, 6, 9, 12 cm
Variables	Tiempo de permanencia en cada parche de tres o más hembras a la vez.
Resultados	Efecto de tratamientos (densidad de hospederos) y bloques (distancia de liberación) sobre las variables (tiempo de permanencia de grupos).

Bibliografía recomendada

- Alphen, J.J.M.; Jervis, M.A. 1996. Foraging behavior. *In*: Insect natural enemies. Chapman & Hall Editors. School of Pure and Applied Biology. University of Wales. Cardiff. U.K. 489 pp.
- Bjorksten, T.A; Hoffmann, A.A. 1995. Effects of pre-adult and adult experience on host acceptance in choice and non-choice tests in two strains of *Trichogramma*. *Entomologia experimentalis et applicata* 76: 49-58.
- Reznik, S.Y.; Umarova, T.Y. 1991. Host population density influence on host acceptance in *Trichogramma*. *Entomol. Exp. Appl.* 58: 49-54.
- Rincón, C.; López-Ávila, A. 1999. Estudios biológicos del parasitoide *Trichogramma lopezandinensis* orientados al control de la polilla guatemalteca de la papa. *Revista colombiana de Entomología*. 25 (1-2): 67-71.
- Schmidt, J.M. 1994. Host recognition and acceptance by *Trichogramma*. *In*: Biological control with eggs parasitoids. International Institute of Biological Control. Berkshire. U. K. 286 pp.

2. Determinación de la Respuesta Funcional del depredador *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) sobre la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae)

El complejo de las denominadas «moscas blancas» es una de las principales limitantes de la producción agrícola en diferentes regiones del mundo y a nivel nacional. En Colombia se encuentra ubicada en los diferentes pisos térmicos del país, desde la parte sur de Nariño hasta la Guajira, ocasionando disminución en los rendimientos en un 25% y un 100%, dependiendo de factores de cultivo, ambientales y de manejo específico de la plaga. Como alternativa al control tradicional de la plaga, se ha evaluado un amplio número de agentes de control biológico dentro de los que se destacan el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*, los parasitoides *Encarsia* spp, *Eretmocerus* spp, *Amitus* spp y el depredador *Delphastus pusillus*; estos organismos han sido evaluados en diferentes países con resultados muy promisorios, al punto que existen empresas privadas y públicas con sus propios sistema de cría y comercialización.

Uno de los factores que influyen en la actividad controladora de un insecto depredador es la densidad de presas durante un periodo de tiempo determinado; Solomon definió el término "Respuesta Funcional" para describir el comportamiento mostrado por los enemigos naturales individuales, frente a la variación, en la densidad de hospedero o presa (Alphen y Jervis, 1996). Con un incremento en la disponibilidad de la presa, se espera que un depredador ataque más individuos, pero hasta un límite por encima del cual el ataque no se incrementa e inclusive puede disminuir. Al graficar los valores de densidad de presas disponibles vs número de presas consumidas, se obtiene la curva de respuesta funcional, característica que presenta cuatro variaciones dependiendo de parámetros como la tasa de ataque (a'), el tiempo de manipulación (T_h) y el tiempo de búsqueda (T_s) (Alphen y Jervis, 1996).

En insectos depredadores la respuesta funcional puede ser medida tanto para los diferentes instares larvales como para los adultos, y en relación con los diferentes estados de la presa atacados.

Objetivos

- Determinar el tipo de respuesta funcional de larvas y adultos del depredador *Delphastus pusillus* sobre los estados de huevo y ninfa de la mosca blanca de los invernaderos.
- Determinar los parámetros: tasa de ataque de presas (a') y tiempo de búsqueda (T_s) de los dos estados del depredador.

Materiales

Plantas de frijol infestados con mosca blanca. Los estados de la plaga a evaluar serán Huevo y Ninfa en tercer instar (N3).

Individuos del depredador *D. pusillus*. (larva tercer instar y adultos)

Aspiradores de boca

Pinceles

Agujas entomológicas

Cajas de Petri

Papel toalla

Tubos eppendorff

Agua

Azúcar

Estereoscopios

Lámparas

Cronómetros o Timers

Metodología

- A partir de las plantas de frijol previamente infestadas con mosca blanca tomar un foliolo con su respectivo peciolo, los que contienen los estados para ser evaluados, que corresponden a Huevo y Ninfa3 (N3).
- Agregar 2 ml de solución azucarada al 50% a un tubo eppendorff.
- Ubicar el peciolo del foliolo dentro del tubo eppendorff y posteriormente este conjunto en cajas de Petri.
- Contar bajo el estereoscopio el número de huevos o ninfas de mosca blanca a evaluar y que corresponden a las densidades de 4, 8, 16, 32 y 64 individuos por foliolo. Estos deben estar ubicados en la parte media del foliolo; retirar los restantes con ayuda de un pincel y de agujas entomológicas.

- Ubicar nuevamente los foliolos infestados en las cajas de Petri con su respectiva tapa. La Figura 1 muestra un esquema de la arena experimental utilizada para las pruebas biológicas.
- Tomar un individuo del depredador previamente sometido a ayuno por 4 hrs. e introducirlo en la arena experimental y sobre el foliolo; los adultos deben ser tomados con aspiradores de boca y las larvas con pinceles finos.
- Realizar observaciones por 2 hrs., y llevar registro del tiempo de manipulación (T_h) que corresponde al tiempo que el depredador gasta en las actividades de captura, muerte, ingestión, y digestión de una presa. Después de 2 hrs. retirar los individuos del depredador y llevar el material vegetal para observación bajo el estereoscopio; realizar conteo de presas atacadas. Las presas depredadas se observan flácidas con su contenido interno total o parcialmente consumido.
- Determinar coeficiente de ataque a' (Ecuación 1), tiempo de búsqueda T_s (Ecuación 2), y número de presas consumidas por densidad del hospedero.

$$a' = \frac{N_a}{T \cdot N} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde N_a es el número de presas atacadas por depredador, T el tiempo total disponible para la búsqueda y N el número de presas disponibles.

$$T_s = T - (T_h \cdot N_a) \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde T es el tiempo total disponible, T_h el tiempo de manipulación y N_a el número de presas atacadas por depredador.

- Graficar densidad de presas suministradas (N) en el eje X Vs número de presas atacadas (N_a) en el eje Y, para cada uno de los estados tanto de la presa (Huevo, Ninfa3) como del depredador (Larva3, Adulto).

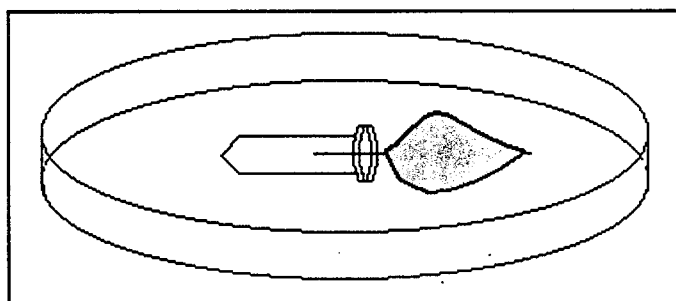


Figura 1. Arena experimental usada en la determinación de Respuesta Funcional de *D. pusillus*

Diseño General del Experimento 3:

Estado depredador	Adulto depredador		Larva del depredador	
	Huevo	Ninfa3	Huevo	Ninfa3
Estado Plaga				
Densidad	4 8 16 32 64	4 8 16 32 64	4 8 16 32 64	4 8 16 32 64
Variables por medir	Tiempo manipulación, presas atacadas por cada densidad de la plaga			
Resultados	Tiempo de búsqueda, Coeficiente de ataque, gráficas de respuesta.			

Bibliografía

- Alphen, J; Jervis, M. 1996. Foraging Behavior. Insect Natural Enemies. Ed. Chapman Hall. pp. 1-62.
- De Bach, P. 1987. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Editorial CECSA. pp. 487.
- García, J.; López-Ávila, A. 1998. Biología y hábitos alimenticios de *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) depredador de moscas blancas. Revista Colombiana de Entomología. 24: 3-4. pp.95-102.
- Hassell, 1980. The Dynamics of Competition and Predation. Department of Zoology and Applied Entomology. Imperial College of Science and Technology. Study in Biology No. 72 pp. 68.
- Heinz, M.K. Parrella, M. 1994. Biological control of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) infesting *Euphorbia pulcherrima*. Evaluations of releases of *Encarsia luteola* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae). In: Environmental Entomology. 23:5. pp. 1346-1353.
- Jervis, M; Kidd, N.1996. Insect Natural enemies. Practical approaches to their study. ED. Chapman and Hall. pp. 476.

Producción Masiva, Separación, Secado y Formulación de Microorganismos Biocontroladores

M. I. Gómez, A. Díaz, M. Forero, O.Y. Pérez. Laboratorio de Control Biológico, Programa Nacional MIP- Corpoica, Centro de Investigación Tibaitatá, Km 14 vía Mosquera – Santafé de Bogotá, Colombia. E – mail: cbiologico@corpoica.org.co

Introducción

La generación de un bioplaguicida se considera como una biotecnología de mediano plazo, ya que el proceso de investigación y desarrollo requiere entre tres y ocho años de dedicación. Su logro implica el cumplimiento de diversas etapas técnicas que aseguren la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo, su conservación, la evaluación de su actividad biocontroladora, el estudio de los mecanismos de acción implicados en dicha actividad, su producción masiva, estudios de preformulación, formulación, determinación de dosis y formas de aplicación, ensayos de campo, estudios de toxicidad, estudios de impacto ambiental, toxicidad, ecotoxicidad, caracterización molecular, estudios de mercado y patentamiento.

La producción masiva de los microorganismos biocontroladores puede llevarse a cabo mediante fermentación semisólida o sumergida utilizando bioreactores con las condiciones aptas (temperatura, pH, oxígeno disuelto, nutrientes, etc) para obtener un rendimiento óptimo. En muchos casos, la actividad biocontroladora está directamente relacionada con el sustrato que se utiliza para su producción. Esta actividad también está relacionada con el manejo que se haga de la biomasa producida, pues factores tales como el método de separación que se utilice para la biomasa, los procedimientos de secado, formulación y las condiciones que se utilicen para su almacenamiento también pueden afectar tanto la viabilidad como la actividad biocontroladora del microorganismo.

Una etapa importante en el desarrollo de un bioplaguicida es la preformulación, la cual se define como un conjunto de actividades organizadas, conducentes a la determinación de las características del principio activo (el microorganismo) y de los cambios químicos, físicos y biológicos que éste pueda sufrir solo o en combinación con los auxiliares de formulación (excipientes) necesarios para la elaboración del producto final.

Basados en los resultados de preformulación se desarrolla la formulación del bioplaguicida, en la cual, el principio activo junto con otros materiales deben formar un producto activo contra la plaga, seguro y fácil de aplicar. Este producto debe tener propiedades de cobertura y adherencia al sustrato en el cual es aplicado. Sin embar-

go, el tipo de formulación que se haga de un microorganismo biocontrolador, debe estar de acuerdo con el hábitat en el que éste vaya a ser aplicado. Si el bioplaguicida ha de ser aplicado en las partes aéreas de la planta, la formulación deberá contener principalmente excipientes que le confieran propiedades de adherencia, tolerancia a la desecación, a altas temperaturas y a la luz ultravioleta del sol; mientras que si éste ha de ser aplicado en el suelo, la formulación deberá contener principalmente excipientes que protejan al microorganismo de la antimicrobiosis del suelo y que le ofrezcan estabilidad ante condiciones de pH adversas, así como una base nutricional que le permita su establecimiento.

Objetivo General

Conocer el proceso de desarrollo de un bioplaguicida con base en microorganismos biocontroladores, siguiendo la secuencia de etapas de: producción masiva, separación, secado y formulación.

La práctica estará dividida en cuatro subprácticas:

1. Producción sumergida de microorganismos biocontroladores
2. Producción de microorganismos biocontroladores en medios sólidos
3. Técnicas de separación y secado de hongos entomopatógenos
4. Formulación de microorganismos biocontroladores

Subpráctica Nº 1: Producción sumergida de microorganismos biocontroladores

Objetivos

- Describir e identificar etapas involucradas en el proceso de producción sumergida de levaduras y de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*.
- Manejar los equipos de laboratorio relacionados con la subpráctica (microscopio, cámara de Neubauer, cabina de flujo laminar, baño termostático, fermentador de 4 litros).
- Aplicar técnicas de laboratorio previamente estandarizadas como: conteo en cámara de Neubauer, preparación de inóculos y ajuste de concentración.

Materiales:

Fermentador de 4 litros con todos sus accesorios
Erlenmeyers de 1000 ml, 500 ml, 250ml y 125 ml.
Beaker

Shaker
Cabina de flujo laminar
Cámara de Neubauer
Cajas de Petri
Pipetas Pasteur
Tubos de ensayo de 5 y 10 ml
Microscopio
Micropipeta de 100 μ l, 5000 μ l con sus respectivas puntas

Metodología:

1. Observar el montaje de levaduras y hongos filamentosos y comparar con las fotos dispuestas para tal fin.
2. Esterilizar con calor seco (mechero) el asa redonda; usar cabina de flujo laminar.
3. Inocular el medio líquido Caldo Extracto Malta con biomasa de levadura proveniente de una caja de medio sólido Agar Extracto Malta previamente crecida.
4. Tomar una muestra de la suspensión del numeral 3 con pipeta Pasteur y depositarla sobre la cuadrícula de la cámara de Neubauer.
5. Leer en un cuadrante de la cámara de Neubauer y calcular la concentración del inóculo y la cantidad de agua destilada estéril necesaria para ajustar a una concentración de 4×10^7 células/ml.
6. Inocular el erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml del medio MLXOM con 10 ml de la suspensión anteriormente preparada y sellar con tapón de gasa-algodón.
7. Ubicar el medio inoculado en el shaker. Ajustar la temperatura y la agitación en los valores previamente estandarizados.
8. Tomar una muestra del caldo del fermentador de 4 litros para realizar la cuantificación de azúcares reductores utilizando el método de Somogyi-Nelson. Comprobar el valor obtenido con el valor esperado para esta variable de respuesta.
9. Observar el crecimiento típico de *Metarhizium anisopliae* en medio líquido en erlenmeyer de 1000 ml.

Resultados

- El caldo proveniente de fermentador de 4 litros presentará una concentración aproximada de 2.5×10^9 células/ml y un rendimiento aproximado en biomasa seca de 5.5 g/l para posterior proceso de separación.
- Después de 4 días de incubación bajo condiciones estandarizadas se ha de obtener una biomasa fúngica de *Metarhizium anisopliae* en medio líquido con una concentración de 1×10^{10} conidios/ml y con un rendimiento en biomasa seca de 1.9 g/l.

Subpráctica No. 2: Producción masiva de microorganismos biocontroladores en medios sólidos

Objetivo

Identificar los procedimientos básicos para la producción masiva en medios sólidos de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* y cuantificar la concentración del hongo *M. anisopliae* por medio del método de conteo en placa.

Materiales

Producción en medio sólido de arroz (*Metarhizium anisopliae*)

Cuatro bolsas de medio sólido arroz previamente preparadas
Una caja de medio de cultivo con hongo esporulado
Asas microbiológicas y sacabocados

Producción en medio sólido de avena (*Beauveria bassiana*)

Cuatro bandejas de medio sólido avena previamente preparadas
6 ml de una suspensión del hongo que contenga 1×10^7 conidios/ml
Rastrillo de Drigalsky y Vórtex

Conteo en placa de unidades formadoras de colonia de *Metarhizium anisopliae*

6 cajas de Petri con medio S.B.R
5 tubos de ensayo con 9 ml de Tween 80 al 0,1%.
0.1 g de conidios de *Metarhizium anisopliae* previamente tamizada.
Pipetas Pasteur de 100 y 1000 μ l.

Metodología

Producción masiva de *Metarhizium anisopliae* en medio sólido de arroz

- Inocular en cabina de flujo laminar cada bolsa de arroz con un disco de medio de *Metarhizium anisopliae* esporulado.
- Tapar y sellar las bolsas
- Incubar las bolsas en cuarto de crecimiento durante doce días con luz constante y a 28°C homogenizándolas diariamente.

Producción masiva de *Beauveria bassiana* en medio sólido de avena

- En cabina de flujo laminar, preparar la suspensión del hongo a inocular, tomando 0.1 g de esporas fúngicas y adicionandolas a un tubo de ensayo con 9 ml de Tween 80 al 0.1%. Agitar en vórtex por un minuto.
- En cabina de flujo laminar, inocular cada bandeja con 1,5 ml de la suspensión del hongo anteriormente preparada y extender a lo largo y ancho de la bandeja con rastrillo de Drigalski.
- Cubrir las bandejas con papel vinipel e incubarlas durante doce días a 28°C.

Conteo en placa de unidades formadoras de colonia de *Metarhizium anisopliae*

- Pesar 0,1 g de conidios de *Metarhizium anisopliae* en un vial esterilizado.
- Agregar la biomasa a un tubo de ensayo que contiene 9 ml de Tween 80 al 0,1%.
- Realizar diluciones sucesivas 10-2, 10-4, 10-6, 10-8, 10-9.
- En cajas de Petri con medio S.R.B. sembrar 100µl de las diluciones 10-8 y 10-9 por triplicado.
- Extender la suspensión en la caja con rastrillo de Drigalski.
- Incubar a 28°C durante cinco días.
- Realizar conteo de las u.f.c. por caja y evaluar los porcentajes de viabilidad.

Resultados

- En cuanto a la producción masiva de *M. anisopliae*, después de los doce días de incubación deben obtenerse bolsas con el medio completamente esporulado color verde oliváceo con una concentración de 2×10^{10} conidios/g de arroz
- En cuanto a la producción masiva de *B. bassiana*, transcurridos los doce días de incubación, deben observarse las bandejas con medio completamente cubierto por biomasa de color blanco y aspecto polvoso, en una concentración de 4.39 u.f.c/cm² de medio.
- En el conteo en placa de *M. anisopliae* después de los cinco días de incubación, deben observarse pequeños puntos de color blanco sobre la superficie del medio que pueden ser contados con facilidad, encontrando una concentración de aproximadamente $7,8 \times 10^{10}$ u.f.c/g

Subpráctica N° 3: Técnicas de separación y secado de microorganismos biocontroladores

Objetivos

- Comprender las bases teóricas de las operaciones de separación y secado de microorganismos biocontroladores.

- Entender el funcionamiento de los equipos involucrados en las operaciones de separación y secado.
- Ubicar las operaciones de separación y secado en la producción de un bioplaguicida con base en el hongo *Metarhizium anisopliae*.

Materiales y equipos

20 tubos Falcon para centrifuga JOUAN G411

Centrifuga de flujo continuo CARL PADBERG

Secador de lecho fluido AEROMATIC

Material biológico: Biomasa fúngica de *Metarhizium anisopliae* producido sobre arroz

Metodología

1. Tomar una bolsa con arroz con *Metarhizium anisopliae* esporulado y mezclarla con 1 litro de tween 80 al 0.1 % para desprender las esporas del sustrato.
2. Pasar la mezcla anterior por un tamiz de malla de 1 mm (2 veces) con el fin de separar el sustrato de producción de la suspensión fúngica.
3. Centrifugar la suspensión fúngica obtenida en el numeral anterior durante 10 minutos (tiempo estimado por litro) a una velocidad de 20.000 rpm en la centrifuga de flujo continuo CARL PADBERG
4. Pesar la biomasa obtenida y colocarla en el secador de lecho fluido (previamente precalentado por 17 min a 50 °C)
5. Graduar el equipo con un flujo volumétrico de aire de entrada de 125-130 m³/h, y una temperatura del aire a la entrada de 50°C.
6. Cambiar el flujo volumétrico de aire de entrada a 105-110 m³/h cuando hayan transcurrido 75 minutos del secado y dejar secar hasta completar 120 minutos, como tiempo total del secado.

Resultados

- Después del proceso de separación se obtendrá biomasa fúngica de *Metarhizium anisopliae* con un porcentaje de humedad del 55% y una concentración de aproximadamente 6×10^{10} ufc/g.
- Después de la operación de secado en el lecho fluido se obtendrá biomasa fúngica de *Metarhizium anisopliae* con un contenido de humedad del 10% y una concentración de 2×10^{10} ufc/g.

Subpráctica N° 4: Formulación de microorganismos biocontroladores

Objetivo

Conocer los diferentes tipos de formulaciones diseñadas con base en hongos entomopatógenos y levaduras tales como suspensiones oleosas, polvos mojables, y granulados

Materiales

Biomasa fúngica de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*-Mezclador HAMILTON BEACH SCOVIL
Granulometro TYLER
Atomizadores

Metodología

Formulación de suspensiones oleosas de aplicación foliar

- Pesar 3 gramos de la biomasa fúngica de *M. anisopliae* previamente secada y tamizada
- Incorporar la biomasa a la suspensión oleosa previamente preparada.
- Mezclar la suspensión en mezclador Hamilton Beach con velocidad constante durante 5 minutos
- Tomar 50 ml de la base oleosa y llevar a 500 ml con agua destilada
- Incorporar la emulsión formada en un atomizador y aplicar el bioplaguicida sobre el material vegetal
- Observar la adherencia del producto.

Formulación de granulados de aplicación al suelo

- Granular la pasta a base del hongo *B. bassiana* previamente preparada en un granulador de malla 2.00 mm.
- Colocar los gránulos formulados en bandejas de aluminio y secarlos a 25°C en estufa de corriente de aire.
- Pesar 150 g de un granulado con base en *B. bassiana* previamente elaborado para determinar el tamaño de partícula usando la técnica de granulometría (Voigth y Borns, 1979) en un shaker vibratorio para tamices marca W.S.Tyler .

- Pasar la muestra por una serie de tamices ordenados de arriba hacia abajo en forma descendente a una velocidad constante durante 9 minutos.
- Pesarse el material retenido en cada uno de los tamices. Los pesos retenidos por cada tamiz son utilizados para trazar una curva de distribución de partículas vs tamaño de malla, en la cual se puede observar el porcentaje del peso retenido por cada uno de los tamices y así determinar el tamaño de partícula y el porcentaje de polvos finos (partículas que pasan a través de la malla) del granulado.

Resultados

- Desarrollo de una suspensión oleosa con base en *M. anisopliae* de una concentración aproximada de 1×10^9 conidios/ml y con buenas características de adherencia sobre la superficie foliar y cutícula de los insectos.
- Desarrollo de un granulado con base en *B. bassiana* de una concentración aproximada de 1×10^{10} conidios/ml y con un tamaño de partícula homogéneo que oscila entre 2.0 y 1.5 mm.

Referencia

Voigth, R.; Borns, M., 1979. Tratado de tecnología farmacéutica. Acribia, Zaragoza. p 181-194.

Técnicas de Colección, Montaje, Preparación, Empaque e Identificación de Agentes Entomófagos

E. Espitia. Programa Nacional MIP- Corpoica. Centro de Investigación Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera. Santafé de Bogotá, Colombia. E-mail: eespitia@corpoica.org.co

Introducción

En esta sesión se tratarán los aspectos relacionados con la colección e identificación de insectos y ácaros, entomófagos o fitófagos, con potencial en el control de malezas o artrópodos plaga.

El desarrollo de trabajos en Control Biológico (Control Biológico) requiere de un conocimiento cierto de las especies sobre las cuales se desarrollan tecnologías de manejo. En Control Biológico, este conocimiento se requiere desde la obtención de material. El material obtenido debe estar en óptimo estado para permitir su montaje con fines de estudios de identificación o para el establecimiento de colonias experimentales o de crías comerciales.

La taxonomía describe o clasifica nuevos taxones e identifica los ya conocidos. Es importante para los trabajos en Control Biológico pues los taxónomos desarrollan clasificaciones que tienden a mostrar relaciones de evolución, revelando detalles asociados de biología y distribución. El trabajo en taxonomía ha sido definitivo para el éxito o el fracaso de programas de Control Biológico. Es muy importante la sistematización, almacenamiento y disponibilidad de la información generada en las colecciones y sus bancos de datos para el éxito en programas de Control Biológico y la organización de la información relacionada con los hospederos, presas y sus enemigos naturales.

El nombre científico es la clave para acceder a la información generada en el mundo sobre la especie en cuestión. En el caso de *Trichogramma* sp., por ejemplo, el género de parasitoides más estudiado en el mundo, la existencia de éste nombre permite saber de cual tipo de parasitoides se está tratando y de los aspectos de biología, comportamiento que se conoce de este parasitoide. Si se especifica aún más, p.e. *T. atopovirilia* la especificidad de la información permite referirse a una especie única en el mundo y sobre la cual los trabajos realizados dan mayor especificidad frente a las posibilidades de uso práctico de este organismo. Aún más importante que contar con un nombre, es el tener el nombre correcto, que revele la identificación precisa del organismo en cuestión.

Las diferencias que establecen la pertenencia de un organismo en un taxón pueden ser muy sutiles pero resultar en grandes diferencias en el status desde el punto de vista agrícola.

Esta ubicación adquiere mayor importancia en Control Biológico por lo cual la taxonomía en estos estudios alude a todas las especies en cuestión. En el caso de un parasitoide, se puede presentar que la estrecha relación biológica con su huésped haga que la expresión fenotípica de aquél dependa en sumo grado de la especie del huésped en el cual se desarrolla.

Ya que la identificación involucra la colecta de material en óptimo estado, se tratará en esta sesión, la obtención de material vivo para diferentes fases en el desarrollo de programas de Control Biológico con entomófagos, incluyendo insectos y ácaros. La obtención de colonias en excelentes condiciones biológicas y en las cantidades adecuadas para cualquier estudio en Control Biológico requiere que se disponga de una metodología apropiada y ajustada para el caso.

En desarrollo de la fase de captura de estos organismos permite obtener información relacionada con el reconocimiento, el comportamiento en condiciones naturales y de las relaciones de la especie de interés y el entorno.

Los aspectos de colecta, identificación y muestreo de insectos son útiles y tienen aplicación en Control Biológico para: el estudio de las interacciones de las especies involucradas, el establecimiento de colonias, seguimiento de poblaciones, el impacto de los enemigos naturales o su efectividad en la implementación del programa de control,

No se detallará acá la descripción de las técnicas generales de uso para cualquier estudio entomológico, como aparecen en las fuentes consultadas, sino la aplicación que tienen en los casos de Control Biológico.

Metodología para la Colecta

Los métodos de colecta de enemigos naturales son esencialmente similares a aquellos empleados para coleccionar artrópodos terrestres. Se caracterizan porque en el caso de enemigos naturales la búsqueda se hace generalmente sobre las plantas huésped más apetecidas por la plaga. Las técnicas de la captura y obtención del material en campo son similares a las de captura de material para identificación pero tienen su mayor diferencia en la manipulación inicial y la disposición que se hace del material en el laboratorio.

La colecta puede ser general, en la cual se pretende hacer un reconocimiento de la entomofauna presente en el hábitat de una plaga determinada y caracterizar a los organismos directamente relacionados con ella como los enemigos naturales sobre la plaga. También puede ser específica si se trata de encontrar los enemigos naturales de una determinada especie o material de alguno de ellos que ya haya sido reconocido.

Las técnicas de colecta y muestreo de insectos en campo son múltiples y aportan información variada. Características de comunidades y poblaciones como abundancia absoluta y

relativa, patrón de dispersión, composición taxonómica, actividad locomotora y fenología, pueden determinarse mediante diversos métodos directos o indirectos.

Colecta directa

De los especímenes. Esta colecta se hace en los sitios donde se espera la aparición de los organismos de interés con el conocimiento previo sobre sus hábitos y las condiciones de cultivo o del hábitat seleccionado para la exploración. Se realiza con la utilización de redes, aspiradores, derribamiento, conteo visual o mediante captura manual.

Del material asociado. Examen de hospederos. De acuerdo a las características de la plaga, de los enemigos naturales, un componente importante de la colecta es el material vegetal que los insectos atacan, especialmente si involucra aquellas plagas que actúan como minadores, taladradores o barrenadores. La colecta masiva de la planta o substrato hospedero, permite posteriormente en laboratorio, la obtención de los estados maduros de los parasitoides y el confinamiento de los estados de la plaga no afectados. Para esto se utilizan las Cámaras para emergencia de parasitoides se deposita el substrato en cámaras adecuadas para facilitar la recolección de los adultos, con salidas laterales o enmallados de diferente poro acoplados a la cámara principal.

Para organismos de poco tamaño como los ácaros o trips también se requiere de la obtención de material vegetal.

Colecta indirecta

Uso de atrayentes. Involucra visuales, olfatorios y uso de hospederos y presas como cebo. La exposición del huésped es empleada para obtener colonias vivas. En esta técnica se exponen plantas infestadas con la plaga, pueden ser silvestres (con aislamiento previo) o llevadas al campo. Se incluyen en las trampas individuos de la plaga en los estados susceptibles para atraer a los enemigos naturales. En este caso la plaga actúa como cebo.

Trampeo. Es utilizado principalmente para obtener material para identificación. Incluye marcado, liberación, recaptura, atrayentes, trampas adherentes. La amplia variedad de tipos de trampas están relacionadas con el conocimiento de la etología de los artrópodos que se quiere capturar. Igualmente este conocimiento llevará al investigador a mejorar o proponer nuevos prototipos apropiados para casos específicos.

Herramientas e instrumentos para la colecta

Trampas. Las trampas son uno de los implementos más útiles para la captura de insectos. Se entiende por trampa cualquier implemento, que usualmente se complementa con un atrayente y que está diseñada para que el insecto de alguna manera entre pero no salga.

Equipo y materiales de colección. Jamas entomológicas, sábana, aspiradores bucales, cámaras letales, gasas, bolsas de papel y plásticas, bomba de caucho adaptada a aguja hipodérmica para suministrar finas gotas de miel, frascos, cámaras letales, lupas, morral multiservicios. Pinzas suaves, pinceles, cuchillo, espátula, linterna, lápiz, rótulos, libreta, cinta para rotular. Esta gama de elementos puede ser adecuada a las condiciones como regla general para su uso se deben organizar y disponer de forma práctica, accesible, liviana y con seguridad para el operario.

Factores a tener en cuenta de los organismos a ser colectados

Conocimiento de la plaga: El colector debe tener un profundo conocimiento de la plaga blanco, sus enemigos naturales, hospederos alternos, distribución, disposición espacial de la población (aleatorio, agregado y uniforme) etc.

Condiciones climáticas: La precipitación y la temperatura y la luminosidad influyen tanto en los artrópodos asociados al Control Biológico, como en los huéspedes y cultivos asociados de los cuales depende la presencia de los benéficos. Conociendo la estacionalidad de estos fenómenos se debe definir el calendario de colecta, de manera que de acuerdo a los hábitos de los artrópodos exista una mayor oportunidad de obtener el material biológico en condiciones y cantidades apropiadas.

Cultivo asociado: se tiene en cuenta el manejo agronómico y el estado de desarrollo, así se determinan las épocas en que es más probable encontrar organismos benéficos asociados y se obtendrá colonias o cepas con adaptación a las condiciones agronómicas bajo las cuales se espera una acción futura de control de la plaga por parte de los organismos benéficos.

Entomofauna asociada: el conocimiento de la entomofauna asociada, ya reportada, permite tener un acercamiento a las especies de organismos que se pueden encontrar en un cultivo o ambiente dado. Con esta relación se puede enfocar la captura u obtención de los organismos naturales de interés para los programas de Control Biológico.

Comportamiento y hábitos de los enemigos naturales: Los diferentes tipos de asociaciones que existen entre los enemigos naturales y la especie plaga determinan su ocurrencia en un ambiente dado. Se dispone así de información sobre su probable presencia en los cultivos o hábitats en los cuales se planea hacer la colecta.

Hábitos de la plaga blanco. Los insectos, sus presas y hospederos raramente se distribuyen al azar y en menor medida aún, en forma regular, encontrando una disposición usualmente de tipo agregado. Frecuentemente se asocia con la distribución localizada del hospedero vegetal. Relación de la plaga con el cultivo: Hospederos alternos de la plaga o hábitat natural de la misma. Ya que la presencia de enemigos naturales en las condiciones de cultivo está limitada por las prácticas agronómicas la exploración del ambiente natural en

que la especie plaga se desarrolla es un sitio adecuado para la búsqueda y obtención de sus enemigos naturales. De acuerdo con el reporte sobre estos hábitats, han de adaptarse las condiciones de captura.

Es necesario coleccionar el material de acuerdo al tipo de organismo que se espera obtener. Para los parasitoides, se deben coleccionar estados inmaduros en sus primeras fases de desarrollo. Igualmente es útil el conocimiento de los estados de la plaga en condiciones normales ya que cualquier sintomatología atípica es indicio de la presencia de un parasitoide. Especialmente huevos ennegrecidos, larvas muy lentas o con flacidez o ennegrecimiento.

Se debe coleccionar la mayor cantidad de material posible teniendo en cuenta que puede existir dificultad de ir a un sitio determinado o encontrar de nuevo las condiciones apropiadas para la captura; igualmente porque el material si es nuevo y no se conoce mucho sobre su manipulación puede sufrir deterioro o pérdidas desde la captura hasta el momento de su estudio. Igualmente se debe obtener toda la información sobre la colecta incluyendo el hábitat y enemigos naturales encontrados.

Los sitios de colecta

Regiones: de acuerdo con el plan de control propuesto las regiones de captura se relacionan con los lugares de origen de las especies en cuestión: la planta de cultivo, la plaga y sus enemigos naturales. Igualmente los sitios de mayor diversidad biológica son áreas en las cuales se espera que la presencia de las especies plaga, en condiciones naturales esté asociada a la de sus enemigos naturales.

Sitios: el sitio de colecta se relacionan con el tipo de plaga. La selección de la planta de cultivo las estructuras de la planta donde se encuentran y el estado de desarrollo de la misma.

Huéspedes

Estados inmaduros: Se realiza colecta de huevos de manera directa para la obtención de parasitoides de huevo y ovo-larvales. Larvas para la obtención de parasitoides de larvas, teniendo en cuenta los hábitos y ocurrencia de las mismas. También se pueden coleccionar pupas que sean susceptibles de ataque o sobre las cuales se espere obtener los adultos de parasitoides que actuaron en fases anteriores.

Adultos: En este caso se coleccionan masivamente mediante colecta directa principalmente o con trampas con el fin de confirmar mediante la captura de inmaduros su presencia en los sitios de colecta o para acelerar el proceso de establecimiento de colonias en condiciones de crías artificiales. Para la captura directa se pueden utilizar jamas, sábanas.

Procesamiento del material colectado

Se debe destinar diariamente tiempo para la distribución y procesamiento del material colectado. El acceso a un laboratorio local sirve para tener los instrumentos ópticos, de manipulación y espacio necesario para el manejo del material.

Coordinación con los colectores

Es indispensable el suministro de la información adecuada sobre el material colectado. Todos los detalles deben ser incluidos, especialmente si el material proviene de diferentes localidades u huésped.

Remoción de parásitos no deseados y patógenos

Deben ser eliminados del paquete de envío para establecer colonias vigorosas. El mantenimiento de los materiales de empaque y la remoción de los restos orgánicos no necesarios reducen la infestación por alguno de estos organismos. Las medidas cuarentenarias complementan estos cuidados en caso de no ser suficientes.

Identificación

La identificación tiene utilidad al comienzo de los planes de Control Biológico o cuando los envíos deben ser confrontados en los lugares de llegada. El acceso a la información y el apoyo técnico son indispensables para la confirmación de la entidad de las especies que son manipuladas. Desde los centros de diagnóstico, museos o especialistas en el área.

Preparación de especímenes

Ya que la morfología es uno de los factores más importantes en la identificación de estos organismos, la preparación debe tener en cuenta la disponibilidad del material en óptimas condiciones para permitir distinguir estas características.

Reactivos y preservantes. Son utilizados para el material que se destinará a identificación. Se emplean para inmovilizar, matar y preservar los especímenes. Para ablandar especímenes se emplea el fluido de Barber, para la fijación de colores se emplea la solución de Kahle, de Hood o la de Bouin. Para matar insectos son utilizados según el tipo de manejo posible, cianuros, acetato de etilo, alcohol etílico o mezcla KAAD o XA.

Pequeños organismos que no están fuertemente quitinizados son montados en láminas para observación en el microscopio de luz. Los montajes permanentes para este material son los más adecuados, el medio más aceptado es el Bálsamo de Canadá. Se utiliza para parasitoides de microhimenoptera y ácaros.

Montaje en triángulos de papel (montaje de punto). Requiere de materiales durables, cartulina bristol preferiblemente, goma hidrosoluble. Revisar su conveniencia frente a otros más prácticos y aceptados por el taxónomo.

Montajes sobre tarjetas, pegando los especímenes sobre tarjetas. Este método protege más los ejemplares pero oculta caracteres que pueden ser importantes y dificulta remontajes. Los Montajes con alfileres minuten sólo se recomiendan si son inoxidables.

La conservación en alcohol etílico del 70% no es muy recomendable ya que la mayoría de los especímenes pierden su coloración. Además de los riesgos por la evaporación del alcohol.

Técnicas de identificación

Claves dicotómicas. Las claves dicotómicas son herramientas documentales que con base en la descripción de características, principalmente morfológicos y sobre los cuales se establecen grados o niveles claramente diferenciables, permiten ubicar un espécimen dentro de una categoría taxonómica de acuerdo al nivel de la clave.

Claves pictóricas. Son herramientas complementarias, preferiblemente usadas en campo, mediante las cuales con base en representaciones gráficas de las especies se identifica el material en estudio mediante comparación.

Catálogos. Son publicaciones sobre la presencia, distribución y ubicación taxonómicas de las especies pertenecientes a un determinado taxón y con respecto a un área geográfica determinada. Permiten confirmar nomenclatura, actualización de los nombres, autores de descripciones, etc.

Especímenes de referencia. Deben ser mantenidos en las estaciones de cuarentena, junto con todos los registros sobre la llegada del material y las observaciones adicionales obtenidas durante el proceso. Copias de estas colecciones deben reposar en las colecciones nacionales de referencia. Las Colecciones de referencia como implemento de los futuros trabajos.

Colecciones de referencia. Son colecciones con material montado disponible para consulta y que representan la entomofauna de una determinada área geográfica. Mediante técnicas de comparación la consulta de la información del banco de datos de la colección es posible identificar el material remitido a ellas si corresponde con el depositado allí.

Envío de material a Centros especializados: Consiste en la consulta a centros y especialistas a nivel mundial. Los Taxónomos de reconocimiento en determinados grupos son pocos en el mundo y la consulta de estos especialistas se hace indispensable cuando no se tienen referencias cercanas en un centro nacional o regional. El centro de envío y el especialista consultado determinan el nivel de identificación que se pueda obtener.

Tecnologías adicionales para identificación

Microscopio electrónico de barrido, es un soporte para la observación de detalles no visibles por los instrumentos ópticos, Permite una fiel representación de detalles principalmente de la conformación cuticular en Hymenoptera parasítica.

Análisis bioquímicos con electroforesis, Técnicas de caracterización molecular con RAPD.

Las técnicas moleculares como herramienta para la identificación tienen la connotación señalada, sin embargo por la precisión con que pueden diferenciar diferentes organismos que por otros medios parecen pertenecer al mismo grupo, cobran altísima importancia en la identificación del organismo correcto para su utilización en programas de Control Biológico, ya que con estas técnicas se han podido diferenciar las adaptaciones de enemigos naturales a determinados nichos.

Para la aplicación de técnicas moleculares los marcadores moleculares involucran en el material genético utilizado: el DNA nuclear, el RNA ribosomal y el DNA mitocondrial; el polimorfismo enzimático; dentro de las técnicas de estudio del DNA: la PCR, RAPD, RFLP, DNA fingerprinting: minisatélites, AFLP. La principal aplicación del uso de estas técnicas está en la biosistemática, reconociendo diferentes biotipos no clarificados por otras técnicas. Además de estos estudios están los de la biología de las poblaciones, estructura de las poblaciones.

Otros métodos que ayudan en la identificación de benéficos y sus relaciones tróficas son: observación en campo de la actividad de enemigos naturales; colecta de presas dentro y alrededor de nidos, refugios y redes de artrópodos benéficos; pruebas de aceptabilidad de presa y hospedero; examen de hospederos en busca de parasitoides inmaduros; análisis fecal; disección intestinal y cría de parasitoides a partir de hospederos.

Registro de la información

Rotulado: La información que acompaña cada muestra debe relacionarse claramente con las muestras mediante codificaciones. Además las muestras se deben etiquetar con los datos claves en los implementos de empaque que contienen las muestras. En el caso de material para identificación cada ejemplar en los montajes secos y cada frasco en los montajes en medio líquido, o cada lámina deben tener dos etiquetas, internacionalmente acepta-

das en tamaño de $\frac{1}{4} \times \frac{1}{2}$ pulg, que contienen, la primera los datos de colector, fecha de colección y lugar, y la segunda, el huésped sobre el cual se colectó la muestra.

Tabulación: El registro de la información de las muestras: colectadas, enviadas, recibidas o identificadas deben quedar registrada en medio escrito y magnético con el fin de disponer de material de consulta y referencia para los trabajos futuros. La organización sistemática de esta información es fundamental para consultas e intercambios futuros.

Reportes de identificaciones: la información generada con las identificaciones logradas en el centro de investigación debe alimentar bases de datos y ser publicada para las consultas o confirmaciones futuras por los investigadores de el mismo y otros proyectos de investigación.

Transporte del Material

Especímenes vivos.

Recomendaciones generales

- Transportar los estados menos activos.
- Enfriar los materiales antes del empaque y transportarse por la vía más rápida.
- Reducir la cantidad de material vegetal incluido en el empaque.
- Controlar la cantidad e humedad en el empaque
- Incluir ejemplares en el mejor estado sanitario posible
- Sellar los empaques hasta último momento antes del envío.
- Enfriar el empaque antes de abrirlo.
- Informar completamente a destinatario sobre las condiciones del envío y de manejo del material.
- Evitar paquetes muy pesados, fijar firmemente los objetos dentro del empaque. Aislar superficies pegajosas.

Recomendaciones según el estado a transportar

Huevos: enfriarlos, eliminar los excesos del substrato de oviposición, Fijar el substrato, o colocar los huevos sobre material absorbente, empacarlos en varias unidades pequeñas en vez de una grande.

Inmaduros: el transporte de larvas activas de lepidópteros y otros debe ser evitado al máximo, tienden al canibalismo, colocar material duro como palillos de madera, o empacarlos individualmente. Los estados que estén dentro de tejidos deben ser empacados *in situ*. Las raíces se les proporciona humedad moderada (musgo Sphagnum) y se envuelven en tela gruesa y pupas se empacan con material que les proporciona humedad moderada (musgo

sphagnum). Si éstas van en número grande deben ser aisladas en lotes más pequeños. Pupas de díptera extraídas del suelo se empaquetan en suelo esterilizado en una serie de pequeños contenedores. Pupas prendidas de ramas se transportan con este material, amortiguándolo firmemente con tiras de papel periódico. Flores secas con larvas en diapausa pueden ser empaquetadas en bulto en bolsas de tela. Estados inmaduros o ácaros en agallas se empaquetan con musgo sphagnum. Se fija bien y se deja espacio para aireación.

Adultos: deben ser enfriados y tener acceso a una superficie absorbente embebida en agua. Evitar los excesos de material vegetal o excesiva cantidad de individuos de la colecta. Coleópteros bien alimentados sobreviven varios días sin alimentación, dípteros, himenópteros y lepidópteros deben tener acceso a agua azucarada o miel.

Se deben empaquetar en una unidad de tamaño mediano que proporcione las condiciones señaladas.

Envíos de especímenes para identificación: Las condiciones óptimas de obtención y montaje del material se deben mantener hasta que el mismo llegue al especialista. Los montajes en alfileres deben quedar firmemente fijados a las cajas de envío. Con los accesorios necesarios dentro de la caja para dar firmeza al montaje y amortiguadores de impacto en un embalaje exterior para proteger el envío.

El material montado y rotulado debe ser enviado a centros especializados de donde se tenga la certeza de la posibilidad del trabajo de identificación. Los empaques deben tener las muestras dispuestas de manera uniforme y se dispone de un empaque individual o un compartimento aparte para cada tipo de montaje. Se debe confirmar con el Centro de recepción el arribo del material en buenas condiciones.

El paquete debe estar perfectamente marcado, con la señalización del contenido y se debe tener un claro conocimiento de las regulaciones oficiales sobre el tráfico de este tipo de material.

Guía de la Práctica

Introducción

El dominio de las técnicas y protocolos para la realización de las actividades de colecta, montaje, preparación, empaque y envío de agentes entomófagos requiere del reconocimiento de los instrumentos y técnicas que den pautas sobre cómo realizarlas.

Con base en este reconocimiento a nivel de laboratorio los estudiantes estarán en capacidad de utilizar correctamente, o adaptar a sus condiciones particulares, los materiales e instrumentos disponibles cuando estén realizando alguna de las actividades en cuestión.

Objetivo

Reconocer en laboratorio los instrumentos y medios de la colecta, montaje, preparación, empaque y envío de agentes entomófagos en control biológico.

Metodología

Lugar: Laboratorios de Entomología, del Programa MIP en el 2º piso del edificio Disciplinas Agrícolas.

Se organizarán grupos de 7 estudiantes. Cada grupo hará un recorrido por cada uno de los laboratorios 1, 2 y 3 donde se examinará el material y se harán observaciones.

Laboratorio 1. Arreglo de muestras.

- Recepción y radicación
- Selección
- Inmovilización
- Cámaras de cría.

Laboratorio 2 . Montaje.

- Tipo de montaje (en seco y en líquido)
- Rotulado
- Conservación

Laboratorio 3 (Colección Taxonómica Nacional). Identificación.

- Colecta directa Trampas
- Reconocimiento de técnicas de Identificación
- Colección de referencia
- Claves

Siga en cada laboratorio la secuencia en que están dispuestos los puestos de observación.

Cuestionario

En cada puesto examine el material y conteste mediante charla con el monitor las siguientes preguntas:

1. Para qué tipo de material es apropiado el uso de cada instrumento?

2. Qué ventajas tiene su uso frente a otros posibles instrumentos?

3. Qué precauciones se deben tener para hacer un uso eficiente y seguro del instrumento?

4. Qué precauciones se deben tener para que el material se maneje en óptimas condiciones?

Bibliografía relacionada con el tema

- Borror, Triplehorn y Johnson. 1992. An Introduction to the Study of Insects. Saunders College Publishing Orlando Florida 875 p.
- De Bach, Paul 1964 Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Compañía editorial Continental, México D.F. 949 p.
- Gordh, G. y Beardsley, J.W. 1999. Taxonomy and Biological Control. En: Handbook of Biological Control. Edited by Thomas S. Bellows y T.W. Fisher Acedemic Press, San Diego, California. 1046 p. P. 45-56.
- Legner, E.F. y Bellows T.S. 1999. Exploration for Natural Enemies. En: Handbook of Biological Control. Edited by Thomas S. Bellows y T.W. Fisher Acedemic Press, San Diego, California. 1046 p.P. 87-102.
- Powell, W.; Walton, M. P.; Jervis, M. A. 1996. Populations and communities. In: Insect Natural Enemies: Practical approaches to their study and evaluation. Edited by Mark Jervis and Neil Kidd. London. Chapman & Hall. p. 223-292.
- Unruh, T.R. y Woolley, J.B. 1999. Molecular Methods in Classical Biological Control. En: Handbook of Biological Control. Edited by Thomas S. Bellows y T.W. Fisher Acedemic Press, San Diego, California. 1046 p.P. 57-86.
- USDA. ARS. 1986. Insects and Mites: Techiques for Collection and Preservation. Miscellaneous Publication Number 1443. 103 p.