



**Producto 9.1: Aprovechamiento de bioproductos para fortalecer la resiliencia climática.**

**Nota técnica documentos de trabajo con protocolos operativos sobre las metodologías del Proyecto e información sobre los hongos benéficos seleccionados.**

**Gloria Barrera, Carolina Ruiz**

**2025**



Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Jenny Carolina Ruiz, Gloria Barrera

Copyright © 2025 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

**FONTAGRO**

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)

[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)



# Tabla de Contenidos

<b>Resumen</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Resumen ejecutivo</b> .....	6
<b>Introducción</b> .....	7
<b>Información de Relevancia con una discusión técnica</b> .....	8
Actividades desarrolladas y relación con los objetivos del proyecto.....	8
Componente 1. Validar el efecto de la aplicación de hongos benéficos para el control de plagas y enfermedades en el cultivo de maíz a nivel de laboratorio e invernadero.....	8
Componente 2. Potencial de la aplicación de hongos benéficos para promover la producción del cultivo de maíz (+5%), la reducción del uso de agroquímicos (-50%), secuestro de carbono en el suelo (+10%) y la tolerancia a la sequía. ....	10
Componente 3. Gestión de conocimiento, comunicación y transferencia. ....	11
<b>Objetivos</b> .....	12
Objetivo del proyecto .....	12
Objetivo de la actividad .....	12
<b>Resultados</b> .....	12
<b>Discusión</b> .....	13
<b>Conclusiones y recomendaciones</b> .....	13
<b>Anexos</b> .....	15
Anexo 1. Protocolo de <i>screening</i> de HEP sobre <i>Diatraea</i> y <i>Spodoptera</i> con inoculación en dorso de las larvas.....	15
Anexo 2. Protocolo de <i>screening</i> de HEP sobre <i>Spodoptera</i> y <i>Helicoverpa</i> con inoculación en sustrato alimenticio. ....	19
Anexo 3. Protocolo de <i>screening</i> de HEP sobre <i>Dalbulus maidis</i> .....	22
Anexo 4. Producción masiva y aislamiento de conidios de <i>Trichoderma</i> sp.....	24



Anexo 5. Producción masiva y aislamiento de conidios de fitopatógenos .....	25
Anexo 6. Pruebas de antagonismo dual <i>in-vitro</i> contra hongos patógenos .....	28
Anexo 7. Caracterización ecofisiológica de aislamientos de <i>Trichoderma</i> .....	29
Anexo 8. Multiplicación de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares - Argentina .....	30
Anexo 9. Multiplicación de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares - Colombia .....	34
<b>Instituciones participantes.....</b>	<b>37</b>



## RESUMEN

La presente Nota Técnica sintetiza los avances del primer workshop del proyecto *Aprovechamiento de bioproductos para fortalecer la resiliencia climática*, realizado en febrero de 2025. En este encuentro, los equipos de Colombia, Argentina y Nueva Zelanda unificaron criterios experimentales y consolidaron más de nueve protocolos operativos para la producción, selección y evaluación de microorganismos benéficos y fitopatógenos.

Los acuerdos incluyeron métodos comunes para bioensayos con hongos entomopatógenos, pruebas de antagonismo *in vitro* y caracterización ecofisiológica. Estos resultados fortalecen la coherencia metodológica del proyecto y preparan la base técnica para las siguientes fases experimentales y futuras evaluaciones en campo.

## ABSTRACT

Technical Note 1 summarises the progress made at the first workshop of the '*Aprovechamiento de bioproductos para fortalecer la resiliencia climática*' project, which took place in February 2025. During this meeting, teams from Colombia, Argentina and New Zealand agreed on experimental criteria and combined more than nine operational protocols for producing, selecting and evaluating beneficial and phytopathogenic microorganisms.

The agreements included standardised methods for bioassays involving entomopathogenic fungi, *in vitro* antagonism tests and eco-physiological characterisation. These results reinforce the project's methodological coherence and lay the technical groundwork for future experimental phases and field evaluations.



## RESUMEN EJECUTIVO

Este documento corresponde al primer entregable de la actividad 3.1 del Componente 3 del proyecto *Aprovechamiento de bioproductos para fortalecer la resiliencia climática*. En él se presenta el trabajo realizado para fortalecer los mecanismos de comunicación y gestión del conocimiento entre las instituciones participantes. Como parte de este proceso, se consolidaron los protocolos operativos que describen las metodologías aplicadas en las distintas actividades del proyecto.

Aquí se resumen los avances presentados durante el primer workshop realizado en febrero de 2025. El encuentro reunió a los equipos de Colombia, Argentina y Nueva Zelanda con el propósito de alinear criterios experimentales, revisar los progresos por actividad y construir, de manera conjunta, los protocolos que guiarán el trabajo técnico del proyecto.

Las discusiones y ejercicios de ajuste metodológico se concentraron en las Actividades 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.3 y 3.2, que abarcan la selección y producción de microorganismos benéficos y fitopatógenos. Asimismo, se definieron los bioensayos de laboratorio para evaluar el desempeño de los microorganismos benéficos frente a hongos patógenos e insectos plaga. Como resultado, se consolidó un conjunto de más de **nueve protocolos estandarizados**, que se establecen como entregables formales y garantizan que los ensayos puedan replicarse y compararse de manera uniforme entre los países participantes.

Entre los avances más destacados se encuentran: (i) la unificación de los métodos de producción de microorganismos benéficos y fitopatógenos; (ii) la elaboración de los protocolos de *screening* para hongos entomopatógenos en cuatro plagas de importancia; y (iii) la definición de metodologías comunes para las pruebas de antagonismo *in vitro* y la caracterización ecofisiológica de los microorganismos priorizados.

En conjunto, estos logros fortalecen la implementación del proyecto y permiten avanzar hacia evaluaciones más robustas del desempeño de los agentes biológicos, preparando el terreno para la fase de validación en condiciones de campo.

**Palabras Clave:** Microorganismos benéficos, protocolos estandarizados, resiliencia climática.



## INTRODUCCIÓN

El proyecto *Aprovechamiento de bioproductos para fortalecer la resiliencia climática* busca desarrollar alternativas basadas en microorganismos benéficos que contribuyan a mejorar la capacidad del cultivo de maíz para enfrentar plagas, enfermedades y condiciones asociadas al estrés hídrico. La iniciativa integra el trabajo conjunto de los equipos de Colombia y Argentina para identificar, producir y evaluar hongos benéficos, entre ellos, hongos entomopatógenos (HEP), hongos antagonistas de patógenos (HAP) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), sobre patógenos e insectos plaga de importancia económica. Asimismo, se estudia su potencial para fortalecer la resiliencia del cultivo frente al déficit hídrico y su contribución al secuestro de carbono en el suelo.

Dado que el desempeño de estos microorganismos está fuertemente influenciado por las interacciones planta–microorganismo–ambiente, es fundamental que los grupos de trabajo cuenten con metodologías consistentes y comparables. Con este propósito, el workshop se enfocó en unificar criterios técnicos, consolidar protocolos operativos y revisar el avance de las actividades definidas en el proyecto.

Los objetivos específicos del encuentro fueron:

- Estandarizar los protocolos para la producción, manejo, evaluación y caracterización de microorganismos benéficos, fitopatógenos e insectos plaga.
- Definir los esquemas experimentales de los bioensayos de control biológico que se desarrollarán en laboratorio e invernadero.
- Verificar el avance técnico de las Actividades 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.3 y 3.2.
- Generar los entregables técnicos correspondientes a esta fase, especialmente los protocolos consensuados.

Esta nota técnica presenta las acciones desarrolladas durante el workshop, los resultados alcanzados y su contribución al avance general del proyecto.



## INFORMACIÓN DE RELEVANCIA CON UNA DISCUSIÓN TÉCNICA

### Actividades desarrolladas y relación con los objetivos del proyecto

El avance del proyecto depende de contar con procedimientos claros y comparables para trabajar con los microorganismos benéficos y los agentes que afectan el cultivo de maíz. Durante el workshop se revisaron los métodos utilizados por cada equipo y se identificaron los ajustes necesarios para que la selección, producción y evaluación de los microorganismos se realice bajo criterios similares.

En esta sección se presentan los aspectos técnicos más importantes relacionados con el trabajo en laboratorio e invernadero, así como las definiciones que se acordaron para unificar los ensayos. También se discuten los puntos críticos que surgieron durante las sesiones de trabajo y su implicación para las actividades que continúan.

### Componente 1. Validar el efecto de la aplicación de hongos benéficos para el control de plagas y enfermedades en el cultivo de maíz a nivel de laboratorio e invernadero.

#### *Actividad 1.1 – Identificación molecular de hongos benéficos -Universidad Nacional de Quilmes (Argentina)*

Se presentó el avance de la identificación molecular y genómica de los hongos benéficos seleccionados en Argentina y Colombia. Esta actividad, enmarcada en el Componente 1, tiene como meta secuenciar y analizar los genomas completos de los aislamientos para lograr una clasificación taxonómica precisa y avanzar en estudios comparativos entre países.

El esquema de trabajo incluye: (i) obtención y caracterización de aislamientos aportados por AGROSAVIA, e INBIOTEC; (ii) extracción de ADN mediante kits comerciales y verificación de calidad; (iii) secuenciación combinada con tecnologías Illumina y Nanopore/PacBio para mejorar el ensamblado de genomas eucariotas; y (iv) procesamiento bioinformático para limpieza, ensamblaje y anotación genética. También se prevé realizar análisis comparativos entre aislamientos y vincular la información genómica con funciones de interés agronómico.

#### *Actividad 1.2 – Evaluación de hongos entomopatógenos– AGROSAVIA (Colombia)*

El equipo presentó los avances en la evaluación de hongos entomopatógenos nativos sobre cuatro especies de plagas del maíz. El enfoque del proyecto se orienta a identificar aislamientos con actividad sobre varias especies y no únicamente sobre un objetivo específico.

Los avances incluyen:

- Selección de seis aislamientos colombianos con antecedentes de eficacia y un aislamiento proveniente de Nueva Zelanda.



- Desarrollo de la metodología para las cuatro especies de insectos *Diatraea sacharalis* (Anexo 1), *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea* (Anexo 2) y *Dalbulus maidis* (Anexo 3), mediante aplicación directa o inoculación en sustrato, según la especie.
- Resultados preliminares en *Diatraea*, donde varios aislamientos superaron el 50% de eficacia.

Se está construyendo un análisis comparativo tipo mapa de calor para priorizar los aislamientos con mayor amplitud de acción.

### **Actividad 1.2 – Evaluación de hongos entomopatógenos– INBIOTEC (Argentina)**

En Argentina, el avance se centró en adaptar la metodología a las condiciones locales y resolver limitaciones logísticas, principalmente la obtención de insectos. Mediante un acuerdo con una empresa agrícola ubicada a 600 km de Mar del Plata, se recibieron larvas de *S. frugiperda*, y se espera contar con *Diatraea saccharalis* más adelante. La disponibilidad de *Dalbulus maidis* dependerá de su recolección en campo, motivo por el cual se planteó la necesidad de repetir estos ensayos en ambos países para asegurar la comparabilidad.

El trabajo en Argentina se desarrollará inicialmente con dos cepas: *Beauveria bassiana* Bb1 y *Metarhizium anisopliae* Ma1. Dado que la mayoría del maíz en el país posee genes Bt, se identificó que el maíz pisingallo (no transgénico) es la opción más adecuada para los bioensayos, junto con otras variedades con y sin Cry confirmados (Anexo 1).

Se discutieron ajustes metodológicos para reducir el estrés por manipulación directa de las larvas, considerando alternativas como la inoculación del hongo en semillas o sobre el follaje. Además, se destacó la importancia de avanzar en los acuerdos de transferencia de material biológico para permitir la evaluación cruzada de cepas entre países.

### **Actividad 1.3. Evaluación de actividad antagonista de hongos nativos antagonistas de patógenos – AGROSAVIA (Colombia)**

En Colombia se avanzó en la evaluación y multiplicación de ocho aislamientos de *Trichoderma* spp. (Anexo 4) frente a cinco fitopatógenos recolectados en el Meta (Anexo 5). Las pruebas de antagonismo *in vitro* (Anexo 6) permitieron identificar aislamientos con alto potencial de control, especialmente Th406, Th008, Th032 y Th003, que mostraron buena inhibición del crecimiento y capacidad de colonización sobre *Macrophomina phaseolina*, *Stenocarpella maydis* y *Fusarium* spp.

La caracterización ecofisiológica (Anexo 7) confirmó que Th032 mantiene crecimiento a temperaturas elevadas (30–35 °C), mientras que el pH no generó diferencias relevantes. Además, se avanzó en la estandarización de la producción de esclerocios de *M. phaseolina*, aunque la propagación de *S. maydis* aún requiere ajustes metodológicos.

Los próximos pasos incluyen completar la caracterización enzimática, optimizar la producción de



inóculo, continuar con las pruebas de patogenicidad y definir los aislamientos con mayor potencial para evaluación en planta.

### **Actividad 1.3. Evaluación de actividad antagonista de hongos nativos antagonistas de patógenos– INBIOTEC (Argentina)**

En Argentina se estableció un sistema de conservación de cepas que asegura la estabilidad de hongos entomopatógenos y agentes de biocontrol, incluyendo *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp., que serán utilizados en los ensayos del proyecto. Paralelamente, se avanzó en la caracterización de tres aislamientos de *Trichoderma* spp. (TH1, TH2 y Tbr1), evaluando su crecimiento en distintos rangos de temperatura y pH (Anexo 7).

Se encuentran en desarrollo los ensayos de antagonismo frente a *Fusarium* spp., utilizando la metodología común definida en el proyecto (Anexo 6). La evaluación de *Macrophomina phaseolina* iniciará una vez se concrete la entrega del aislamiento solicitado a una colección nacional.

Los siguientes pasos contemplan completar los ensayos con *Fusarium*, incorporar *M. phaseolina* al sistema experimental y profundizar en la caracterización de los hongos seleccionados, generando información que respalde su eventual uso en procesos de formulación y registro en Argentina.

## **Componente 2. Potencial de la aplicación de hongos benéficos para promover la producción del cultivo de maíz (+5%), la reducción del uso de agroquímicos (-50%), secuestro de carbono en el suelo (+10%) y la tolerancia a la sequía.**

### **Actividad 2.1. Estandarización de metodología para medición de carbono en diferentes fracciones del suelo– AgResearch (Nueva Zelanda)**

AgResearch presentó los avances en la definición de una metodología común para medir la estabilización de carbono en el suelo. Durante esta fase, el trabajo se ha centrado en resolver los acuerdos administrativos necesarios para formalizar la cooperación entre países.

En paralelo, se realizó un análisis comparativo de metodologías de fraccionamiento de carbono, evaluando seis enfoques disponibles. Como resultado, los métodos de fraccionamiento de agregados y fraccionamiento químico fueron identificados como las opciones más viables para implementar en el proyecto. La decisión final y el proceso de estandarización iniciarán una vez se formalicen los convenios institucionales.

### **Actividad 2.3. Evaluación del efecto de hongos benéficos seleccionados sobre tolerancia a sequía– INBIOTEC (Argentina)**



INBIOTEC presentó los avances en la obtención y multiplicación del material micorrízico necesario para los ensayos de tolerancia a sequía. Se trabajó inicialmente con esporas provenientes de colecciones institucionales, utilizando plantas trampa de raigrás, aunque la colonización fue baja en el primer mes, lo cual es esperable para este tipo de hongos.

Para acelerar el proceso, se estableció un sistema complementario basado en raíces micorrizadas conservadas, con el fin de activar más rápidamente el micelio fúngico (Anexo 8). Este segundo sistema se encuentra en desarrollo y será evaluado en las próximas semanas.

### **Actividad 2.3. Evaluación del efecto de hongos benéficos seleccionados sobre tolerancia a sequía– AGROSAVIA (Colombia)**

AGROSAVIA avanzó en la multiplicación de dos cepas micorrízicas de referencia: *Rhizophagus irregularis* y *Acaulospora mellea*, provenientes del Banco de Germoplasma de Microorganismos de Colombia. La multiplicación se realizó en sustrato esterilizado y mediante un sistema escalonado de bandejas germinadoras y materas (Anexo 9).

El análisis preliminar muestra buena uniformidad y concentración de esporas, y ya se enviaron muestras para identificación molecular. También se presentó un diseño inicial para los ensayos de déficit hídrico en maíz, que contempla diferentes niveles de riego y tratamientos con micorrizas individuales y combinadas.

## **Componente 3. Gestión de conocimiento, comunicación y transferencia.**

### **Actividad 3.2. Fortalecimiento de estrategias de comunicación y transferencia de ofertas tecnológicas– INBIOTEC (Argentina)**

INBIOTEC presentó los avances en comunicación y transferencia tecnológica, destacando la realización del taller “Bioinsumos y nanotecnologías para la productividad vegetal”, que reunió cerca de 75 participantes de la academia, sector regulatorio y empresas. El evento facilitó el intercambio sobre regulación y nuevas tecnologías de formulación, y derivó en la elaboración de un libro conmemorativo (con ISBN) y un repositorio digital de materiales. El balance general fue positivo, fortaleciendo redes interinstitucionales clave para el proyecto.



## OBJETIVOS

### Objetivo del proyecto

Generar una estrategia para mejorar la producción (+5%) y la resiliencia del cultivo de maíz al cambio climático mediante el uso e integración de hongos benéficos.

### Objetivo de la actividad

Generar un espacio técnico de intercambio y construcción conjunta entre los equipos de investigación de los países participantes, orientado a discutir, unificar y validar las metodologías empleadas en el proyecto, así como a compartir los avances y resultados obtenidos en torno al uso de hongos benéficos para el control biológico y la promoción del crecimiento vegetal.

## RESULTADOS

En el primer workshop participaron 24 asistentes, de los cuales 17 pertenecían a AGROSAVIA, 1 a AgResearch, 3 a INBIOTEC y 2 a la Universidad Nacional de Quilmes. Durante las sesiones de trabajo se consolidaron nueve protocolos técnicos, incluidos en los anexos de este documento:

- Anexo 1. Protocolo de screening de HEP sobre *Diatraea* y *Spodoptera* con inoculación en dorso de larvas
- Anexo 2. Protocolo de screening de HEP sobre *Spodoptera* y *Helicoverpa* con inoculación en sustrato alimenticio.
- Anexo 3. Protocolo de screening de HEP sobre *Dalbulus*
- Anexo 4. Producción masiva y aislamiento de conidios de *Trichoderma* sp.
- Anexo 5. Producción masiva y aislamiento de conidios de fitopatógenos
- Anexo 6. Pruebas de antagonismo dual in-vitro contra hongos patógenos
- Anexo 7. Caracterización ecofisiológica de aislamientos de Trichoderma
- Anexo 8. Protocolo de multiplicación de HFMA – Argentina
- Anexo 9. Protocolo de multiplicación de HFMA – Colombia



La consolidación de estos protocolos representa uno de los principales logros del workshop, ya que permite unificar criterios metodológicos, reducir la variabilidad entre grupos de trabajo y asegurar que los ensayos puedan ser replicados y comparados de forma consistente en los países participantes. Esta estandarización es clave para garantizar la calidad de los datos, fortalecer la interpretación conjunta de resultados y avanzar hacia validaciones robustas en etapas posteriores del proyecto.

## DISCUSIÓN

El workshop permitió cerrar brechas técnicas entre los equipos y establecer las bases metodológicas necesarias para asegurar la comparabilidad de los resultados entre países. La consolidación de los protocolos marca el punto de partida para el desarrollo formal de los ensayos experimentales y disminuye la variabilidad asociada a la producción de microorganismos, el manejo de plagas y el diseño de bioensayos.

Los avances presentados en las Actividades 1.1, 1.2 y 1.3 permiten contar con información sólida sobre las características ecofisiológicas de los microorganismos benéficos, su capacidad de antagonismo y su desempeño en condiciones controladas. De igual forma, garantizan que los insectos plaga y los hongos entomopatógenos puedan evaluarse bajo criterios homogéneos. Por su parte, la Actividad 2.3 asegura la disponibilidad continua y estandarizada de hongos formadores de micorrizas arbusculares, que serán fundamentales para los ensayos en invernadero y campo.

En conjunto, estos avances fortalecen la base técnica del proyecto y preparan el escenario para las siguientes fases de validación en condiciones reales de cultivo.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

- Se avanzó en la estandarización de los protocolos necesarios para la implementación del proyecto, garantizando la comparabilidad entre países. En total, se consolidaron nueve protocolos operativos.
- Se definieron los esquemas experimentales para la producción y caracterización de los microorganismos benéficos, así como para la evaluación de su actividad biocontroladora en ensayos de laboratorio, permitiendo avanzar en la fase de ejecución.
- El progreso de las actividades evidencia un cumplimiento técnico sólido y coherente con lo previsto en los componentes del proyecto.



## **Recomendaciones**

- Realizar pruebas piloto para validar los protocolos antes de iniciar las réplicas formales.
- Mantener una comunicación fluida entre los equipos para resolver de manera oportuna las dudas operativas que puedan surgir durante los primeros ciclos experimentales.



## ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo de *screening* de HEP sobre *Diatraea* y *Spodoptera* con inoculación en dorso de las larvas.

El objetivo de este procedimiento es establecer los lineamientos para determinar la eficacia de hongos entomopatógenos (HEP) mediante la inoculación dorsal de larvas de *Diatraea saccharalis* (para Colombia y Argentina) y *Spodoptera frugiperda* (para Argentina) bajo condiciones controladas de laboratorio. Para ello, se emplean bioensayos diseñados para evaluar la capacidad biocontroladora de los HEP a través de la infección por contacto. En este proceso, los conidios del hongo se adhieren a la cutícula de las larvas y, mediante la acción de enzimas hidrolíticas, penetran su cuerpo, provocando la muerte del insecto y completando su ciclo de infección.

Con el fin de garantizar la validez de los resultados, se incluyen dos tratamientos: un control sin inoculación y otro infectado con la suspensión del hongo, lo que permite diferenciar la mortalidad atribuible exclusivamente a la acción del agente de biocontrol.

#### MÉTODOLOGÍA

Para determinar la eficacia de hongos entomopatógenos sobre larvas de *Diatraea saccharalis* y *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones de laboratorio, se debe partir de una caja de Petri con medio PDA que contenga el hongo a evaluar, del cual se raspan los conidios con un asa estéril y se suspenden en 5 mL de Tween 80 al 0,1 %, agitando vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea y concentrada. Posteriormente, se toman 100  $\mu$ L de la suspensión y se transfieren a 900  $\mu$ L de Tween 80 al 0,1 %, realizando diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$ . La concentración se determina mediante conteo de conidios en cámara de Neubauer. Una vez establecida la concentración, se prepara una suspensión ajustada a  $1 \times 10^6$  conidios/mL para su uso en los bioensayos.

Para el montaje del testigo absoluto, se preparan copas plásticas de 0,5 oz con una servilleta estéril en la base y un grano de maíz tierno en cada una (Figura 1, A). Con ayuda de un pincel estéril, se colocan individualmente larvas sanas y vigorosas sobre los granos de maíz y se tapan las copas, repitiendo el procedimiento tres veces, lo que corresponde a tres réplicas de 15 larvas cada una. Las copas se almacenan en recipientes SelloPlus® de 32 oz, debidamente marcados con la información del tratamiento, fecha y responsable, y se incuban durante 15 días a 25 °C y 70 % de humedad relativa.



En el caso de Argentina, adicionalmente se germinaron semillas de maíz seleccionadas (variedades no Bt), que fueron colocadas individualmente en vasos plásticos con papel secante húmedo como base (Figura 1, B). Este manejo buscó garantizar una fuente de alimento vegetal estandarizada y libre de interferencia genética en los bioensayos con *D. saccharalis* y *S. frugiperda*. Adicionalmente, los ensayos fueron repetidos en un sistema estandarizado, sobre una matriz nutricional semisintética libre de conservantes destinada a sostener el desarrollo larval de ambos insectos en condiciones controladas. La formulación base incluyó los siguientes componentes para un rendimiento final de 1 kg de dieta (modificado de Murúa et al., 2003 y Alves et al., 1998): porotos alubia (71 g), germen de trigo (20 g), levadura de cerveza virgen en polvo (17 g), agar-agar (16 g) y agua destilada (500 mL). Los porotos alubia se cocinaron en agua corriente durante dos horas, luego se escurrieron y se procesaron en licuadora junto con un cuarto del volumen total de agua destilada, hasta obtener una suspensión homogénea. Paralelamente, el volumen restante de agua se utilizó para dispersar el agar-agar a temperatura ambiente. Esta mezcla se calentó con agitación continua hasta alcanzar el punto de ebullición y lograr la completa disolución del agar. Una vez preparado el gelificante, se incorporaron la levadura de cerveza y el germen de trigo, junto con la suspensión de porotos, utilizando un mezclador de inmersión para asegurar una homogeneización completa y evitar la formación de grumos. La mezcla resultante se cocinó a fuego moderado durante diez minutos, manteniendo agitación constante para garantizar una distribución uniforme de todos los componentes. La dieta, aún caliente, se vertió en contenedores plásticos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se almacenó bajo refrigeración hasta su utilización en los bioensayos. La dieta fue fraccionada en porciones de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> y colocados sobre el papel secante dentro de cada vaso plástico, donde fueron agregadas las larvas individualmente (Figura 1, C).



Figura 1. A) Larvas individualizadas en copas plásticas con grano de maíz. B) Larvas individualizadas en copas plásticas con semillas de maíz germinadas para ensayos en Argentina. C) Larvas individualizadas en copas plásticas con porciones de dieta artificial para ensayos en Argentina.



La evaluación de la eficacia del hongo se realiza seleccionando aproximadamente 50 larvas de segundo instar, las cuales se inoculan con 2  $\mu$ L de la suspensión de conidios en el dorso, utilizando una micropipeta. Cada larva se deja reposar por 5 segundos y luego se transfiere a una copa plástica de 0,5 oz con un grano de maíz como sustrato de alimentación (Figura 2). La suspensión se agita cada 15 larvas para mantener su homogeneidad. Posteriormente, las copas se tapan y distribuyen en tres recipientes SelloPlus®, a razón de 15 copas por cada uno, que se almacenan a 25 °C y 60 % de humedad relativa.



Figura 2. Aplicación en el dorso de la larva de *D. saccharalis*.

La mortalidad se registra cada tres días durante 15 días, reemplazando el grano de maíz cuando este se deteriore. Las larvas muertas se colocan en cámara húmeda para confirmar la infección por el hongo entomopatógeno mediante la observación de esporulación sobre las larvas (Figura 3).



Figura 3. Larva de *D. saccharalis* con signos de infección por *B. bassiana*.



Finalmente, el porcentaje de eficacia se calcula utilizando la fórmula de Schneider-Orelli (Zar, 1999),

$$Eficacia (\%) = \left( \frac{(b - k)}{(100 - k)} \right) * 100$$

Donde:

**b** = % de individuos muertos en el tratamiento con el agente de control.

**k** = % de individuos muertos en el testigo absoluto.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Alves, SB. 1998. Controle Microbiano de Insetos. 2° Ed. Piracicaba: Fundacion de Estudios Agrarios Luiz de Queiroz (FEALQ).
2. Murúa, M. G., E. G. Virla y V. Defagó. 2003. Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Bol. San. Veg. Plagas, 29: 43-51.
3. Zar, J. (1999). Biostatistical Analysis. Cuarta edición. (Prentice H)



## Anexo 2. Protocolo de *screening* de HEP sobre *Spodoptera* y *Helicoverpa* con inoculación en sustrato alimenticio.

El objetivo de este ensayo es establecer los lineamientos para determinar la eficacia de hongos entomopatógenos (HEP) mediante la inoculación del sustrato alimenticio (granos de maíz) sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* bajo condiciones de laboratorio, en Colombia. Para ello, se emplean bioensayos controlados que permiten evaluar la capacidad biocontroladora de los HEP mediante la infección por contacto. En este proceso, los conidios del hongo se adhieren a la cutícula de las larvas y, a través de la acción de enzimas hidrolíticas, invaden su cuerpo, provocan la muerte del insecto y completan el ciclo de infección. Dado que estas especies son particularmente susceptibles a la manipulación directa, la inoculación se realiza sobre los granos de maíz que sirven como sustrato alimenticio, permitiendo una infección más natural y reduciendo el estrés o daño mecánico en las larvas.

Con el fin de garantizar la validez de los resultados, se incluyen dos tratamientos: un control sin inoculación y un tratamiento infectado, que permiten diferenciar la mortalidad atribuible exclusivamente a la acción del hongo.

### MÉTODOLÓGÍA

Para determinar la eficacia de hongos entomopatógenos sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* bajo condiciones de laboratorio, se debe partir de una caja de Petri con medio PDA que contenga el hongo a evaluar, del cual se raspan los conidios con un asa estéril y se suspenden en 5 mL de Tween 80 al 0,1 %, agitando vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea y concentrada. Posteriormente, se toman 100  $\mu$ L de la suspensión y se transfieren a 900  $\mu$ L de Tween 80 al 0,1 %, realizando diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$ . La concentración se determina mediante conteo de conidios en cámara de Neubauer. Una vez establecida la concentración, se prepara 60 mL de una suspensión ajustada a  $5 \times 10^6$  conidios/mL para su uso en los bioensayos.

Para el montaje del testigo absoluto, se preparan copas plásticas de 0,5 oz con una servilleta estéril en la base y un grano de maíz tierno en cada una. Con ayuda de un pincel estéril, se colocan individualmente larvas sanas y vigorosas sobre los granos de maíz y se tapan las copas, repitiendo el procedimiento tres veces, lo que corresponde a tres réplicas de 15 larvas cada una. Las copas se almacenan en recipientes SelloPlus® de 32 oz, debidamente marcados con la información del tratamiento, fecha y responsable, y se incuban durante 15 días a 25 °C y 70 % de humedad relativa.

Para la evaluación de la eficacia del hongo entomopatógeno sobre larvas de insectos, se debe tomar la suspensión de conidios previamente preparada y sumergir en ella 50 granos de maíz,



agitando de forma circular durante un minuto y medio (Figura 1). Posteriormente, los granos se dejan secar durante 5 minutos antes de su uso. Cada grano inoculado se coloca en una copa plástica de 0,5 oz que contenga una servilleta en el fondo. Con ayuda de un pincel estéril, se ubica una larva de segundo instar del insecto a evaluar sobre cada grano de maíz previamente inoculado. Las copas se tapan y se distribuyen en tres recipientes Selloplus®, colocando 15 copas por recipiente, los cuales deben ser debidamente marcados y almacenados en el cuarto de bioensayos, bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad relativa (60 %).

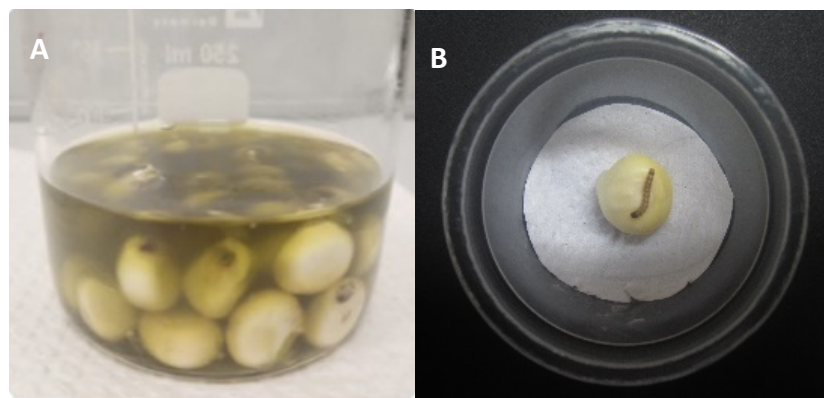


Figura 1. A). Inmersión de granos de maíz en la suspensión fúngica. B). Larvas individualizadas en copas plásticas con grano de maíz.

La mortalidad de las larvas se registra a los 7 y 11 días posteriores a la inoculación, utilizando el formato correspondiente. Los granos de maíz deben reemplazarse el día 5, 7 o en el momento en que presenten signos de deterioro. Finalmente, las larvas muertas se trasladan a una cámara húmeda con el fin de confirmar la mortalidad causada por el hongo entomopatógeno mediante la observación de su esporulación (Figura 2).

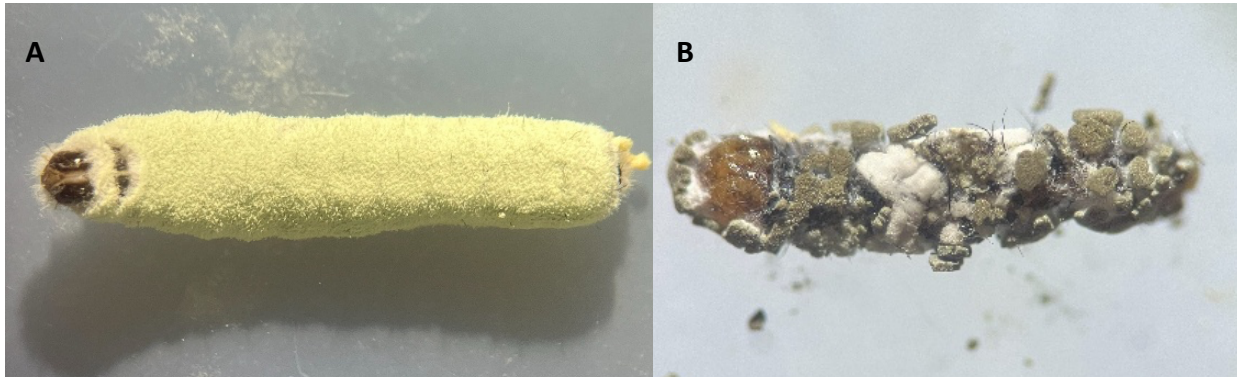


Figura 2. A). Larva de *S. frugiperda* con signos de infección por *Metarhizium rileyi*. B). Larva de *H. zea* con signos de infección por *Metarhizium robertsii*

Finalmente, el porcentaje de eficacia se calcula utilizando la fórmula de Schneider-Orelli (Zar, 1999),

$$Eficacia (\%) = \left( \frac{(b - k)}{(100 - k)} \right) * 100$$

Donde:

**b** = % de individuos muertos en el tratamiento con el agente de control.

**k** = % de individuos muertos en el testigo absoluto.

## BIBLIOGRAFÍA

Zar, J. (1999). *Biostatistical Analysis. Cuarta edición.* (Prentice H).



### Anexo 3. Protocolo de *screening* de HEP sobre *Dalbulus maidis*

El objetivo de este ensayo es establecer los lineamientos para evaluar la eficacia de hongos entomopatógenos (HEP) aplicados por aspersión en plantas de maíz, con el fin de determinar su efecto sobre *Dalbulus maidis* bajo condiciones de casa de malla en Colombia. Para ello, se emplean bioensayos controlados que permiten medir la capacidad biocontroladora de los HEP mediante infección por contacto. En este proceso, los conidios del hongo se adhieren a la cutícula del insecto y, a través de la acción de enzimas hidrolíticas, penetran el tegumento, colonizan el interior del huésped, provocan su muerte y completan el ciclo de infección.

Con el fin de garantizar la validez de los resultados, se incluyen dos tratamientos: un control sin inoculación y un tratamiento infectado, que permiten diferenciar la mortalidad atribuible exclusivamente a la acción del hongo.

#### MÉTODOLOGÍA

Para determinar la eficacia de hongos entomopatógenos (HEP) sobre *Dalbulus maidis* bajo condiciones de laboratorio, se parte de una caja de Petri con medio PDA que contenga el hongo a evaluar. Los conidios se raspan con un asa estéril y se suspenden en 5 mL de Tween 80 al 0,1 %, agitando vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, se toman 100  $\mu\text{L}$  de esta suspensión y se transfieren a 900  $\mu\text{L}$  de Tween 80 al 0,1 %, realizando diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$ . La concentración se determina mediante conteo en cámara de Neubauer. Una vez establecida, se preparan 15 mL de suspensión ajustada a  $1 \times 10^7$  conidios/mL para su uso en los bioensayos.

Las plántulas de maíz, de entre 10 y 12 días de edad, se asperjan con la suspensión de conidios utilizando un atomizador manual, aplicando aproximadamente 1,6 mL por planta, cubriendo tanto el haz como el envés de las hojas. Cada planta tratada se ubica en una jaula individual elaborada con tela de tul, donde se introducen 10 adultos de *D. maidis* por unidad experimental (Figura 1). Se establecen tres repeticiones por tratamiento, con un total de 30 insectos por tratamiento.

El tratamiento control consiste en plantas sin inocular con el hongo. Las unidades experimentales se mantienen bajo condiciones ambientales controladas, con una temperatura promedio de 27 °C y una humedad relativa cercana al 72 %. El monitoreo del ensayo se realiza los días 3 y 5, y la mortalidad de los insectos se registra a los 10 días postratamiento.



Figura 1. **A).** Planta de maíz inoculada con los tratamientos fúngicos. **B).** Ubicación de los tratamientos en jaulas de tela de tul

Finalmente, el porcentaje de eficacia se calcula utilizando la fórmula de Schneider-Orelli (Zar, 1999),

$$Eficacia (\%) = \left( \frac{(b - k)}{(100 - k)} \right) * 100$$

Donde:

**b** = % de individuos muertos en el tratamiento con el agente de control.

**k** = % de individuos muertos en el testigo absoluto.

## BIBLIOGRAFÍA

Zar, J. (1999). *Biostatistical Analysis. Cuarta edición.* (Prentice H).

## Anexo 4. Producción masiva y aislamiento de conidios de *Trichoderma* sp.

El incremento de inóculo y la recuperación de conidios de *Trichoderma* sp. son pasos fundamentales para asegurar la disponibilidad de material biológico de buena calidad para ensayos de laboratorio, invernadero y campo, producción de bioproductos o estudios de compatibilidad y eficacia. Este procedimiento describe el método para multiplicar el hongo en un sustrato sólido a base de arroz y salvado, y posteriormente recuperar y cuantificar los conidios obtenidos. El protocolo estandariza las condiciones de crecimiento, recolección y conteo, garantizando la reproducibilidad y la viabilidad del material producido.

### Metodología

Mezclar arroz blanco tradicional y salvado de trigo en proporción 4:1, y servir 16 g de la mezcla en bandejas de aluminio pequeñas. Adicionar 20 mL de agua destilada a cada bandeja, tapar con papel aluminio y esterilizar a 121 °C por 30 minutos. Una vez frías, asperjar de manera uniforme 2 mL de una suspensión de conidios de *Trichoderma* sp. a  $10^6$  conidios/mL obtenida desde cultivo en caja de Petri, e incubar a 28 °C durante 10 días. Transcurrido este tiempo, transferir 10 g de biomasa a una solución de Tween 80 al 0,1%, agitar vigorosamente y filtrar con muselina. Finalmente, realizar el conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de conidios de cada cepa evaluada.

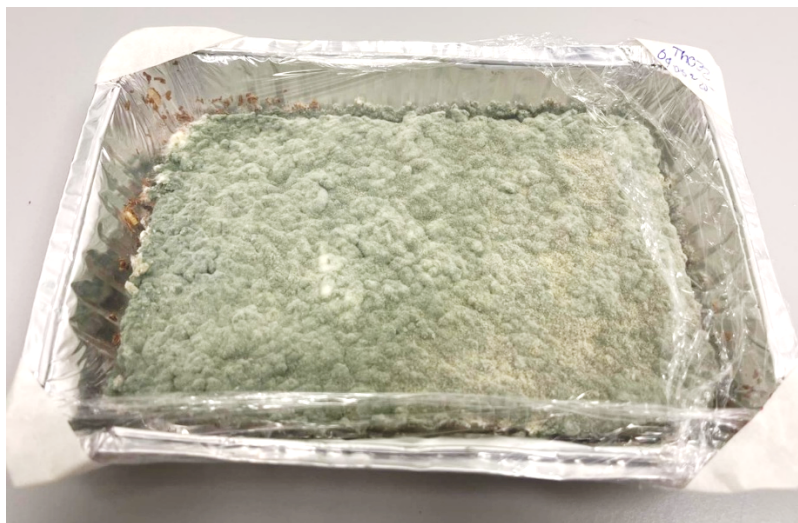


Figura 1. Bandeja con medio arroz y salvado de trigo con crecimiento de *Trichoderma* sp.

## Anexo 5. Producción masiva y aislamiento de conidios de fitopatógenos

La producción masiva de estructuras infectivas de hongos fitopatógenos es un paso fundamental para el desarrollo de ensayos de patogenicidad, antagonismo y evaluación de biocontrol. Para este propósito, se estandarizaron procedimientos específicos según el tipo de estructura producida por cada patógeno. En el caso de *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. equiseti*, se llevó a cabo la multiplicación en medio líquido con el fin de obtener suspensiones concentradas de conidios. Para *Macrophomina phaseolina*, se empleó un sustrato sólido que permite la formación abundante de microesclerocios, los cuales posteriormente fueron recuperados y purificados. Finalmente, para *Stenocarpella maydis*, se utilizó semilla de maíz como sustrato para favorecer la formación de picnidios y la liberación de esporas. Estos procedimientos permitieron obtener inóculos homogéneos y de alta calidad para las diferentes aplicaciones experimentales.

### ***Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. equiseti***

1. Preparar caldo papa-dextrosa (PDB) desde medio deshidratado, según indicaciones del fabricante.
2. Agregar 20 mL de PDB a matraces de 50 mL y un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de los hongos patógenos de interés.
3. Incubar en agitación constante a 28 °C y 150 rpm por 21 días.
4. Tras este tiempo, los matraces se deben agitar en vórtex por 10 segundos a máxima velocidad. Filtrar la solución de los matraces con muselina para separar micelio y obtener solamente la solución de conidios.
5. Realizar conteo en cámara de Neubauer para cada solución y determinar la concentración de conidios para cada especie de *Fusarium* sp.



Figura 1. Crecimiento de *Fusarium* sp en medio PDA



### **Microesclerocios para *Macrophomina phaseolina***

1. En matraces de 500 mL agregar aproximadamente 200 mL de mezcla de arena y harina de maíz estéril junto a cuatro discos de PDA de 5 mm de diámetro, por contenedor, con micelio del patógeno.
2. Sellar los matraces con tapón respirable y puestos en incubación a 28 °C en total oscuridad por 21 días.
3. Pasado este tiempo, con ayuda de una palita de metal larga, remover todo el sustrato en el interior de cada contenedor.
4. Luego, los microesclerocios se separan del sustrato tamizando con tres tamices seriados (212  $\mu\text{m}$ , 106  $\mu\text{m}$  y 53  $\mu\text{m}$  de diámetro) y con ayuda de flujo de agua de un grifo común.
5. Lo resultante en el tamiz de 53  $\mu\text{m}$  se recupera con papel filtro dispuesto en un embudo.
6. Finalmente, cada papel filtro se dispone en una caja de Petri destapada y se deja secar en incubadora a 28 °C por tres días. Tras este tiempo, los microesclerocios se pueden transferir y conservar en un Falcon de 15 o 50 mL.

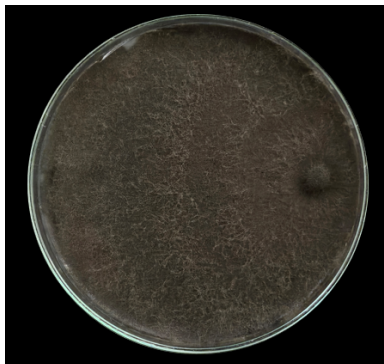


Figura 2. Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en medio PDA

### ***Stenocarpella maydis***

1. Lavar las semillas de maíz a utilizar en solución de Tween 20 al 0.5% en agua destilada poniéndolas en agitación alta (>600 rpm) por 15 minutos; realizar dos enjuagues de 10 minutos con agua destilada en agitación alta.
2. Dejar las semillas en remojo durante 12 horas al menos.
3. Poner las semillas de maíz en bandejas pequeñas de aluminio, asegurándose que solo haya una capa uniforme de semillas en el fondo del contenedor y no se amontonen. Agregar 15 mL de agua destilada a cada bandeja y tapar con aluminio.
4. Autoclavar por 30 minutos a 121 °C.

5. Una vez las semillas estén a temperatura ambiente se adiciona a cada contenedor tres discos de PDA con micelio de *S. maydis* de 5 mm de diámetro.
6. Los contenedores se sellan con plástico delgado transparente y son puestos en fotoperiodo de 12 horas a 28 °C y 70 % de humedad relativa por 45 días.
7. Pasado este tiempo, el contenido de los contenedores se debe macerar o licuar en solución al 0.2% de Tween para romper los picnidios y liberar las esporas. Esta solución es filtrada con muselina.
8. En cámara de Neubauer realizar el conteo de esporas para determinar la concentración de estas en la solución resultante.

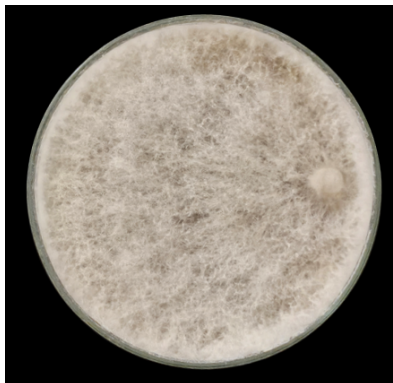


Figura 3. Crecimiento de *Sternocarpella maydis* en medio PDA

## Anexo 6. Pruebas de antagonismo dual *in-vitro* contra hongos patógenos

Las pruebas de antagonismo *in vitro* permiten evaluar la capacidad de *Trichoderma* sp. para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos bajo condiciones controladas. Este tipo de ensayo es una herramienta fundamental para seleccionar cepas con potencial biocontrolador, ya que permite observar de manera directa la competencia por espacio y nutrientes, así como posibles interacciones antibióticas entre los microorganismos. A través de este procedimiento se compara el crecimiento del patógeno en presencia del antagonista frente a su crecimiento normal, lo que permite cuantificar el efecto inhibitorio y determinar el porcentaje de reducción del desarrollo micelial.

### Metodología

Preparar placas de Petri con 25 mL de PDA estéril. En cada placa, colocar un disco de 5 mm con micelio de *Trichoderma* a 1 cm del borde y, en el extremo opuesto, colocar un disco de 5 mm con micelio del hongo fitopatógeno correspondiente; preparar placas con los controles individuales de cada patógeno sin antagonista. Incubar las placas a 28 °C en oscuridad durante 5 días o hasta que el micelio del testigo cubra el 80–90 % del área de la placa. Registrar diariamente el crecimiento radial de cada organismo, medir los diámetros miceliales y calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIC) usando la fórmula:

$$PIC = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

Donde  $R_1$  es el radio de crecimiento del patógeno en las placas control y  $R_2$  el radio de crecimiento en presencia del antagonista.

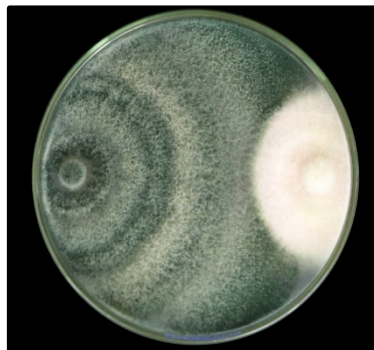


Figura 1. Prueba de antagonismo de *Trichoderma* sp vs *F. oxysporum*

## Anexo 7. Caracterización ecofisiológica de aislamientos de *Trichoderma*

La evaluación del efecto de la temperatura y el pH sobre el crecimiento micelial de los aislamientos de *Trichoderma* es fundamental para identificar las condiciones óptimas que favorecen su desarrollo y actividad biológica. Este tipo de pruebas permite seleccionar cepas más robustas y estables, capaces de mantenerse activas en diferentes ambientes y sistemas de cultivo. Además, estos resultados son clave para orientar futuros ensayos en laboratorio, invernadero y campo, y para garantizar que los microorganismos seleccionados cumplan de manera efectiva su función dentro del proyecto.

### Metodología

Se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento micelial de los aislamientos de *Trichoderma*. Para el ensayo de pH, se preparó una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL y se inocularon 2  $\mu$ L en el centro de cajas de Petri con medio PDA previamente ajustado a pH 3, 5, 7 y 9, utilizando soluciones de HCl o NaOH 0,1 N. Las cajas inoculadas se incubaron a 25 °C en oscuridad. Para el ensayo de temperatura, 2  $\mu$ L de la misma suspensión de conidios fueron sembrados en el centro de cajas con PDA sin modificar, incubándolas en cámaras independientes a 15, 20, 25, 30 y 35 °C (Figura 1). En ambos ensayos, el crecimiento micelial se registró cada 24 horas durante 5 días, midiendo el diámetro de la colonia mediante dos lecturas perpendiculares con un calibrador digital. Cada condición experimental se evaluó con tres réplicas biológicas independientes.



Figura 1. Crecimiento de *Trichoderma* sp. TH003 a diferentes temperaturas. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo se muestra el crecimiento a 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Se evidencia que la temperatura influye tanto en la velocidad de crecimiento micelial como en las características morfológicas de la colonia.



## Anexo 8. Multiplicación de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares - Argentina

La multiplicación de esporas y propágulos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plantas trampa constituye un paso esencial para asegurar la disponibilidad de material biológico de calidad para futuros ensayos en laboratorio, invernadero y campo. Este procedimiento permite obtener inóculos frescos, abundantes y homogéneos, indispensables para estandarizar evaluaciones, garantizar la reproducibilidad experimental y cumplir con las metas técnicas establecidas en el proyecto. Contar con propágulos viables y caracterizados asegura que las siguientes etapas de validación y escalamiento se desarrollen sobre una base biológicamente consistente y confiable.

### Metodología

#### I. Esterilización del suelo en microondas/congelado.

La metodología consistió en rociar el suelo con agua destilada en una proporción de 100 mL por cada 2 kg de sustrato; colocar el suelo en un contenedor adecuado e introducirlo en el microondas durante tres minutos en la opción *Calentar*, removiendo el sustrato a los 1,5 minutos y continuando hasta completar el tiempo (Figura 1).



Figura 1. Esterilización del suelo en Microondas

Dejar enfriar el suelo a temperatura ambiente y repetir el ciclo de calentamiento y enfriamiento dos veces más; esperar 24 horas y colocar el suelo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas; descongelar el suelo a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas; repetir nuevamente dos ciclos de calentamiento en microondas y enfriamiento; y mantener finalmente el suelo a temperatura ambiente hasta su uso.

#### II.- Extracción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en suelo-inoculo por tamizado en húmedo y centrifugación en solución azucarada

A partir de inóculos previamente conservados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en INBIOTEC, proceder a extraer las esporas para su multiplicación transfiriendo 100 g de suelo-inóculo a un balde plástico de 2 L; humedecer



y disgregar los terrones de suelo presionándolos con los dedos o contra las paredes del balde, y suspender el suelo en agua utilizando una varilla de vidrio mediante movimientos circulares durante 1 minuto; dejar en reposo por aproximadamente 1 minuto y verter el líquido flotante sobre un sistema de tamices superpuestos, ubicando el de mayor abertura en la parte superior (Figura 2).



Figura 2. Extracción de esporas mediante tamizado en húmedo y centrifugación en solución azucarada

Repetir el proceso al menos dos veces más hasta obtener agua limpia; descartar el suelo remanente del balde y recoger el material retenido en el tamiz de 74  $\mu\text{m}$ , transfiriéndolo con ayuda de una piseta a un tubo de centrífuga de 50 mL; centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos y retirar cuidadosamente el sobrenadante sin perturbar el sedimento. Agregar una solución azucarada al 60 % hasta completar aproximadamente 40 mL y suspender completamente el precipitado; centrifugar nuevamente a 2000 rpm por 2 minutos y verter el sobrenadante sobre un tamiz de al menos 53  $\mu\text{m}$  evitando arrastrar el material sedimentado; lavar el material retenido en el tamiz con agua corriente para eliminar residuos de sacarosa y transferirlo finalmente con agua destilada, utilizando una piseta, a una placa de Petri para proceder a la extracción y cuantificación de las esporas bajo lupa binocular.

### III. Aislamiento de esporas de HMA y multiplicación en plantas trampa

Proceder a aislar las esporas extraídas en el procedimiento II colocándolas manualmente en una placa de Petri con agua destilada para separarlas de las partículas de suelo y levantarlas con una pipeta. Mezclar el suelo esterilizado obtenido en el punto I con perlita y vermiculita estériles (autoclavadas) en proporción suelo:perlita/vermiculita 1:1 en volumen y utilizar esta mezcla como sustrato para llenar micromacetas tipo speding; colocar semillas estériles de ryegrass y



verificar la germinación a los 3 días; adicionar en cada micromaceta esporas individuales previamente extraídas (Actividad II), las cuales no deben ser esterilizadas ni mediante ultrasonido ni mediante antibióticos; mantener las Plantas Trampa en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y temperatura (12 h luz/12 h oscuridad, 24 °C) hasta su desarrollo (Figura 3).



Figura 3. Ensayo de multiplicación de esporas de HMA en Plantas Trampa

#### **IV.- Multiplicación de propágulos de HMA en plantas trampa a partir de raíces de maíz colonizadas**

Multiplicar propágulos de HMA en plantas trampa a partir de raíces de maíz colonizadas mezclando el suelo esterilizado del punto I con perlita y vermiculita estériles (autoclavadas) en proporción suelo:perlita/vermiculita 1:1 en volumen y utilizando esta mezcla para llenar micromacetas tipo spedling; colocar en el centro del sustrato dos segmentos de raíces de maíz provenientes del mismo fragmento, previamente verificados para confirmar la colonización por HMA, sin esterilizar y eliminando únicamente el sustrato adherido mediante lavado con agua destilada; cubrir los segmentos de raíces con sustrato y sembrar en la parte superior semillas estériles de ryegrass; mantener las Plantas Trampa en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y temperatura (12 h luz/12 h oscuridad, 24 °C).



Figura 4. Multiplicación de propágulos de HMA asociados a raíces de maíz, en Plantas Trampa



## Anexo 9. Multiplicación de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares - Colombia

Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA), son microorganismos benéficos que se asocian con las raíces de las plantas, permitiendo la optimización en la toma y transporte de nutrientes y agua. Estos hongos son simbioses obligados, por lo que su multiplicación y escalamiento es un proceso complejo que requiere de la presencia de una planta para que el hongo pueda completar su ciclo de vida y aumentar sus poblaciones.

Un inóculo de HFMA contiene propágulos capaces de infectar las raíces de las plantas (micelio, esporas y raíces micorrizadas). Existen diversas metodologías que permiten el escalamiento de estos propágulos, los cuales varían dependiendo del soporte que se emplee en el escalamiento.

Para el caso de la propagación de HFMA en este proyecto, está se desarrolla en un medio de soporte sólido, el cual es el más ampliamente difundido a nivel mundial y se basa en la metodología propuesta por Morton, 1990.

### Metodología

Para el proceso de escalamiento en soporte sólido de HFMA se emplearon dos cepas de referencia (*Rhizofagus irregulare* y *Acaulospora mellea*) las cuales han mostrado ser altamente cosmopolitas y tener una alta eficiencia en diversos cultivos de interés agrícola (Figura 1). Estas cepas provienen del Banco de Germoplasma de Microorganismos con potencial biofertilizante y hacen parte de la colección de trabajo del grupo de investigadores de AGROSAVIA.

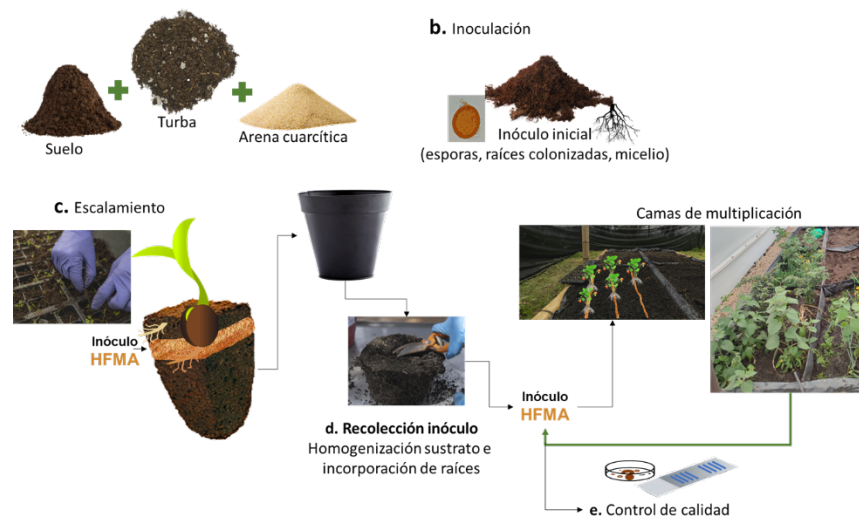


Figura 1. Multiplicación y escalamiento de HFMA en sustrato sólido. a. Preparación del sustrato b. inoculación inicial c. Escalamiento d. recolección de inóculo e. control de calidad

Como se muestra en la figura el proceso de escalamiento y producción de inóculo de HFMA, tiene en términos generales cinco pasos:



- a. Preparación de inóculo: Se emplea una mezcla v/v en relación 2:1:1 de suelo, turba y arena cuarcítica. El sustrato se homogeniza y se deja por un período de 20 días en desinfección y solarización.
- b. Inoculación inicial: Se selecciona una planta trampa u hospedera la cual se inocula desde la siembra en semillas en bandejas de germinación con el inóculo de referencia. Se aplican 70 esporas de HFMA por cada semilla.
- c. Escalamiento: El escalamiento consiste en el incremento gradual del volumen de sustrato. Para casos de multiplicación y concentración de poblaciones de HFMA se realiza una aplicación de inóculo en cada paso del escalamiento. Se inicia con una inoculación inicial (b), una vez la planta trampa completa el ciclo en esta etapa de germinación se trasplanta a materas de 250 g con el mismo sustrato y se aplican 350 esporas por cada planta. Escalonadamente se aumenta el volumen de sustrato, y se incrementa en cada paso la cantidad de esporas a inocular en un 25%. El proceso finaliza, dependiendo de la cantidad de inóculo requerido en eras de multiplicación. En cada paso del escalamiento se realiza la cuantificación de esporas presentes en una muestra. En caso de ser necesario dependiendo de la planta trampa se realiza una nueva siembra en cada paso.
- d. Recolección de inóculo: Una vez las plantas trampa alcanzan su ciclo, se dejan en un periodo de estrés hídrico de 2 a 3 semanas y se realiza la recolección del sustrato, al cual se incorporan las raíces finamente picadas, se tamiza y homogeniza el sustrato y se realiza un control de calidad final.
- e. Control de calidad: Se realiza la cuantificación de esporas presentes en una muestra, cuya metodología se basa en la propuesta por Gerdermann y Nicolson, 1963 (Figura 2) de tamizado y decantado húmedo y se cuantifica el porcentaje de raíces micorrizadas de la planta trampa (Figura 3) de acuerdo con la metodología propuesta por Philips y Hayman, 1970.

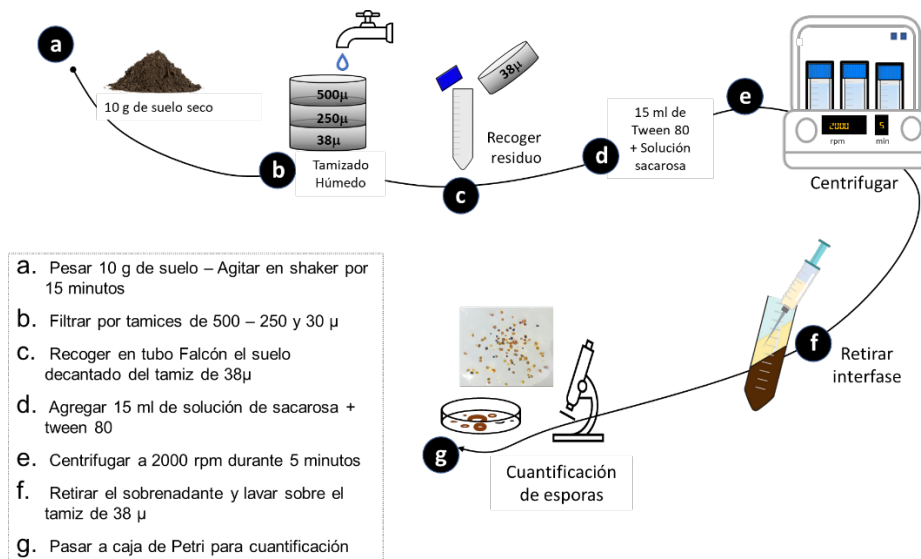


Figura 2. Metodología para la cuantificación de esporas de HFMA

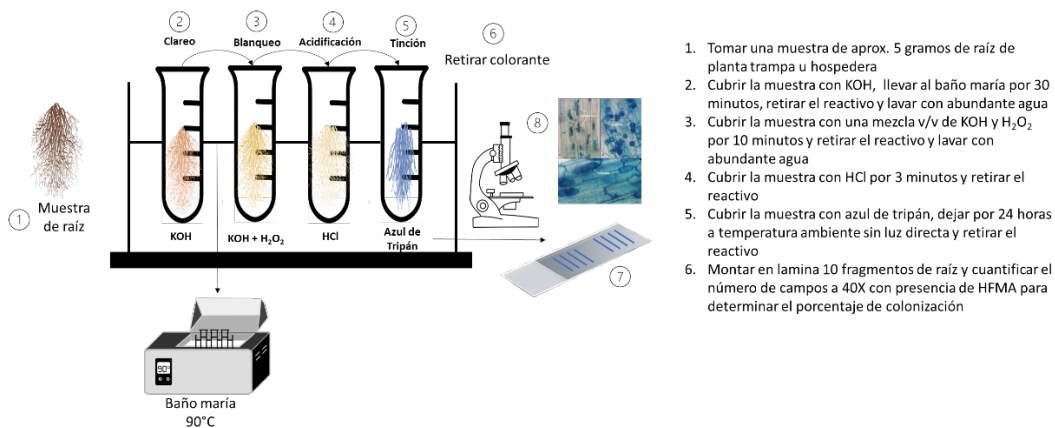


Figura 3. Metodología para la determinación del porcentaje de colonización de raíces por parte de los HFMA

## Bibliografía

Gendermann, J. W. & Nicolson, T. H., 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species, extracted from soil by wet-sieving and decanting. In: Transactions of the British Mycological Society. Vol 46. p. 235-244.

Phillips JM, Hayman DS, 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. In: Trans. Br. Mycol. Soc. Vol.55. p.158-161



## INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)