

Desarrollo de un medio de cultivo para la propagación de esporas de hongos entomopatógenos

Castro-Franco, R.¹, Meza-Herrera, C.A.¹, Lechuga-Flor, M. M.¹,
García-Alvarado, J. S.²

¹Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. A.P. 8, Bermejillo, Durango. México. 35230. E-mail: rcastro_franco@yahoo.com.mx

²Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

(Aprobado: Septiembre, 2000)

Resumen. Las formas infectivas de los hongos entomopatógenos son las esporas y los conidios. Uno de los impedimentos para su uso como controladores biológicos de enfermedades-plaga, desde un punto de vista comercial, es la dificultad de obtener formulaciones de medios de cultivo a bajo costo y que produzcan esporas con una alta viabilidad, patogenicidad y largo período de sobrevivencia después del secado y almacenamiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar la formulación de medios de cultivo para producir altas concentraciones y peso seco de esporas. Las formulaciones incluyeron como componentes comunes al medio base (MB), y harina de soya (HS), y como componentes diferenciales a 1). Quitina (Q); 2). Concha brescal (CB), y 3). Cutícula de Camarón (CC). En cada medio fueron evaluadas cuatro concentraciones diferentes de estos últimos componentes, así como de HS. El diseño experimental completamente al azar incluyó un arreglo factorial de tratamientos 3x4. El efecto de las concentraciones de los componentes diferenciales, así como de HS consideró ANOVA. El peso seco fue afectado ($P < 0.001$) por tratamientos (T); la mejor respuesta ($P < 0.05$) se observó en los basados en CC ($\mu = 1.549$ gramos). El número de blastosporas fue afectado ($P < 0.001$) por T, especie (E) y la interacción (TxE). El mejor desarrollo blastosporas de *Aschersonia spp* ($\mu = 118 \times 10^6$), *Beauveria bassiana* ($\mu = 10.66 \times 10^6$) y *Paecilomyces fumosoroseus* ($\mu = 140.6^6$) incluyó los componentes 0.5 g de HS, 2.0 g de CB y 100 ml. Los medios de cultivo a base de CC proporcionaron los mayores peso seco y número de esporas.

Palabras clave: Propagación, esporas, conidios.

Summary. The infective forms of entomopathogen

fungi are both spores and conids. One of the impediments for they use as biological controllers of plant diseases or plagues, from a commercial stand point, resides in the difficulty to obtain media culture formulations at low costs. In addition, these formulations must have the ability to produce spores with long viability, high pathogenicity as well as a long survival period once dried and stored. The objective of this study was to evaluate the formulation of low cost culture media to produce both increased fungus dry weight as well as high concentrations of spores. The culture media formulated had as common components to Minimum essential media (MEM), and soybean meal (SBM), and as differential components to 1). Chitine (Q); 2). sea-shell (CB), and 3). shrimp cuticle (CC). Four different concentrations of these last components were evaluated in each media. The experimental design included an arrangement of treatments in a 3x4 factorial fashion. Effects of using different concentrations of the last component in the dry weight and blastospore number of the three fungal specie were evaluated by ANOVA in a completely random design. Dry weight was affected ($P < 0.001$) by treatments (T); the best response ($P < 0.05$) was observed cultures based on CC ($\mu = 1.549$ grams). Blastospore number was affected ($p < 0.001$) by T, fungus specie (S), and the SxT interaction. The best blastospore development of *Aschersonia spp* ($\mu = 118 \times 10^6$), *Beauveria bassiana* ($\mu = 10.66 \times 10^6$) and *Paecilomyces fumosoroseus* ($\mu = 140.66 \times 10^6$) included 0.5 grams of HS, 2.0 grams of CB and 100 mL. Results of this research highlight

feasibility in the development of culture media formulation at low costs. Cultures based on shrimp cuticle were a better option to increase fungus dry weight and blastospore number.

Key words: Propagation, esporas, conids.

INTRODUCCION

Los hongos entomopatógenos ocupan un lugar importante en el control biológico de insectos-plaga (Berlangu, 1997), ya que infectan al hospedero a través de la pared del cuerpo o adhesión de la conidia a la cutícula del insecto, mediante los espiráculos, y en la parte media del intestino una vez que han sido ingeridos los conidios (Maddox, 1990). En efecto, se ha comprobado el potencial de algunos hongos como insecticidas naturales, sus esporas contienen metabolitos que causan efectos fisiológicos adversos en los insectos (Jackson *et al.*, 1996).

Dentro de los hongos entomopatógenos destacan *Aschersonia spp.*, *Beauveria bassiana*, y *Paecilomyces fumosoroseus*. Las formas infectivas de los hongos entomopatógenos son las esporas y los conidios. Una de las limitantes para su uso comercial es la dificultad de obtener formulaciones de bajo costo, que produzcan esporas con alta viabilidad, patogenicidad y largo periodo de sobrevivencia después del secado y almacenado.

Según Stainer *et al.*, (1979) y Jackson *et al.*, (1996), la formulación de un medio de cultivo debe proporcionar una mezcla balanceada de los nutrientes en niveles adecuados que permitan el desarrollo de los mismos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la formulación de medios de cultivo capaz de producir altos pesos secos y concentraciones de esporas a bajo costo

MATERIALES Y METODOS

Localización y condiciones ambientales. El presente estudio se desarrolló en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Aridas-

Universidad Autónoma Chapingo, localizada entre las coordenadas UTM (Universal Transversa Marcator) 639,935 E y 2,864,331 N, y las coordenadas geográficas 25°52'28" LN y 103°37'07" LO, a una altitud de 1119 msnm, con clima seco-cálido BW, y lluvias en verano. La oscilación térmica es extrema, con una precipitación media anual de 217.1 mm y temperatura anual promedio de 22.3°C.

Material biológico: Hongos entomopatógenos. Tanto los hongos utilizados como inóculo fueron obtenidos de la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico dependiente de la SAGAR. Las cepas se conservaron a 4°C, en tubos inclinados con un medio de cultivo compuesto por agar 15.0 g, neopeptona 10.0 g, dextrosa 40 g y extracto de levadura 10.0 g, disueltos en un litro de agua destilada. La identificación de las especies con las que se trabajó fueron *Aschersonia spp* (A₁ V 2204), *Beauveria bassiana* (BbCH IV 3007) y *Paecilomyces fumosoroseus* (MBP1 2104).

Medios de cultivo. La composición del medio base fue por 2.0 g de KH₂PO₄, 0.4 g de CaCl₂-H₂O, 0.3 g de MgSO₄-7H₂O, 37 mg de CoCl₂-6H₂O, 50 mg de FeSO₄-7H₂O, 16 mg de MnSO₄-H₂O, 14 mg de ZnSO₄-7H₂O. Como fuente de carbono se utilizó glucosa (8.0 g/l) disueltos en un litro de agua destilada adicionándose polivitaminas. Se realizaron tres medios de cultivo, los cuales tenían como componentes comunes al medio base (MB) y harina de soya (HS), mientras que los componentes diferenciales incluyeron Quitina (Q), Concha Brescal (CB) y Cutícula de Camarón (CC); de estos últimos componentes y de la HS se evaluaron cuatro dosis diferentes. En total se elaboraron 12 tratamientos.

Para la elaboración de los T1 a T4 se

mezclaron todos sus componentes. En los T5 a T8 se descalcificaron las conchas con ácido clorhídrico 2N durante 24 h, se lavaron y se desecaron. La muestra se trituró hasta obtener partículas que pasaran por un tamiz malla 40 y se le agregaron los demás componentes. Los T9 a T12 incluyeron camarón seco el cual se lavó con agua destilada, se colocó en ácido clorhídrico 2N

durante 24 h, se lavó, se desecó y se le desprendió la cutícula para macerarse hasta obtener partículas que pasaran por un tamiz malla 40. En matraces de 300 ml se prepararon cuatro soluciones con CC y HS (Cuadro 1). Cada solución fue filtrada en bomba de vacío.

CUADRO 1. Composición de los tratamientos (T) para el crecimiento de tres especies de hongos entomopatógenos constituidos por Medio Base (MB, mL), Harina de Soya (HS, g), Quitina (Q, g), Concha Brescal (CB, g), y Cutícula de Camarón (CC, g)

T	MB	HS	Q	T	MB	HS	CB	T	MB	HS	CC
1	100	2.5	0.0	5	100	2.5	0.0	9	100	2.5	0.0
2	100	1.0	1.5	6	100	1.0	1.5	10	100	1.0	1.5
3	100	0.5	2.0	7	100	0.5	2.0	11	100	0.5	2.0
4	100	0.0	2.5	8	100	0.0	2.5	12	100	0.0	2.5

A todos los tratamientos se les ajustó el pH a 5.5. Cada matraz se esterilizó en una autoclave a una presión de 20 lb por 20 min. Los matraces con los medios se inocularon con cada una de las especies, después se colocaron en el agitador durante 66 h, pasado este tiempo se separó el micelio y esporas de los hongos y observar el crecimiento de los hongos. Para obtener la medida de peso seco, la biomasa (micelio) se secó a 30°C, hasta obtener un peso constante. El conteo de blastosporas se realizó en una cámara de Neuvahuer (Hemacitómetro) con un coeficiente de dilución 10⁶.

Análisis estadísticos. Las variables respuesta fueron peso seco en gramos y número de blastosporas. La primera utilizó un diseño experimental completamente al azar con método robusto (rangos), evaluando los efectos de tratamientos y especie. Para número de blastosporas se aplicó un diseño experimental completamente al azar evaluando la especie con tres niveles y los tratamientos con 12 niveles. Se realizó un análisis de correlación entre las variables peso seco y número de blastosporas. Todos los análisis utilizaron los procedimientos del SAS (1988).

RESULTADOS Y DISCUSION

Peso seco. Se observó un efecto de tratamientos ($P < 0.0001$) (Cuadro 1). Los medios de cultivo con mayor crecimiento incluyeron la cutícula de camarón (CC), harina de soya (HS) y medio base (MB) en todas sus proporciones ($\mu = 1.549$). La especie no afectó ($P < 0.1662$) el peso seco. *Beauveria bassiana* ($\mu = 0.7378$) y *Aschersonia sp* ($\mu = 0.6934$) fueron similares entre sí, pero diferentes con respecto a *Paecilomyces fumosoroseus* ($\mu = 0.3711$). Lo cual sugiere que esta última especie tuvo mayor requerimiento nutricional o canalizó su energía a la producción de estructuras infectivas (esporas o conidias). Con respecto al efecto de tratamientos, en los T1 a T4 no hubo crecimiento micelial en ninguna de las especies. En los T5 a T8 si hubo crecimiento pero menor al observado en T9 a T12.

Bidochka *et al.*, (1991) reportó que el crecimiento en quitina fue menor en ausencia de proteínas y lípidos, mientras que Willis (1987) sugirió que las proteínas, no la quitina, son los mayores componentes cuticulares. Debido a lo anterior, en los primeros ocho

tratamientos no hubo un buen crecimiento. El mayor crecimiento se obtuvo en los T9 a T12, formulados a base de CC, compuesta en su mayoría por proteínas, quitina y lípidos. Mientras que a los primeros cuatro se les agregó

quitina, los T5 a T8 fueron adicionados con concha descalcificada, la cual se convierte a quitina mediante la siguiente reacción:



CUADRO 2. Análisis de Varianza para el factor Peso Seco en gramos transformado a rangos

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	Pr>F
Tratamiento	11	2986.8333	271.5303	45.55	0.0001
Especie	2	23.4333	11.7166	1.97	0.1662
Error	20	119.2333	5.9616		
Total	33	3129.5000			

R² = 0.961900 C. V. = 13.95230 \bar{x} = 0.6143

Número de Esporas. El número de esporas fué afectado por tratamiento, (P<0.0001), la especie (P<0.0001) y su interacción (P<0.0001). El mejor tratamiento para la especie *Aschersonia spp* fué T7 ($\mu=118.00 \times 10^6$). Según Smith y Grula (1983), los hongos sintetizan proteínas diferentes en medios de cultivo diferentes. Los resultados obtenidos no coinciden con Hegedus *et al.*, (1990) quienes encontraron que en el

medio suplementado con quitina cruda se obtuvo menor número de blastosporas, mientras que la suplementación con N-acetil-D-Glucosamina (GlcNac), el número fue mayor. En general, los tratamientos compuestos por HS, CC Y MB mostraron mayor uniformidad con respecto a la biomasa generada lo cual pudo ser debido a que en los tratamientos a base de CC se liberó GlcNac.

CUADRO 3. Análisis de varianza para la variable Numero de Blastosporas

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	Pr>F
Especie	2	107349.685	53674.8426	4641.22	0.0001
Tratamiento	11	33430.1019	3039.1002	262.79	0.0001
Esp * Trat	22	27014.9815	1227.9537	106.18	0.0001
Error	72	832.6667	11.5648		
Total	107	168627.435			

R² = 995062 C. V = 6.923212 y = 49.1203704

Para *Beauveria bassiana*, no existió diferencia entre los primeros once tratamientos, únicamente el T12 mostró diferencias. Sin embargo, los T5 a T8 fueron los que produjeron mayor cantidad de

blastosporas. Se puede inferir que esta especie prefiere la CB como fuente de Carbono, Nitrógeno y energía. Para *Paecilomyces fumosoroseus* se observaron los

mejores resultados con el T7 ($\mu=140.66 \times 10^6$). Dicho comportamiento sugiere que la quitina de la concha, comparada con la quitina comercial y la que contiene la cutícula de camarón, libera con mayor facilidad la N-acetil-D-Glucosamina, o bien que ésta especie tiene preferencia nutricional por los compuestos de la concha. Los T3, T7 y T11, los cuales coinciden en las proporciones de sus componentes, mostraron un comportamiento similar en las tres especies, y mostraron un mejor comportamiento al compararlas con las restantes.

Correlación entre número de esporas y peso seco en gramos. Para *Aschersonia spp.*, se observó una correlación lineal, positiva y significativa entre número de esporas y peso seco ($r=0.4020$, $P=0.0151$); a menor peso seco mayor fue el número de esporas. Con respecto a *Beauveria bassiana*, se observó una correlación lineal y negativa entre el número de esporas y peso seco ($r= -0.4440$, $P=0.0067$); a mayor peso menor fue el número de esporas. Con respecto a *Paecilomyces fumosoroseus*, la correlación lineal no fué significativa ($r=0.28980$, $P=0.1203$).

CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación confirman que la manipulación de los parámetros nutricionales pueden ser explotados a favor de la producción de peso seco, de eporas o de ambos. Para la obtención de peso seco se recomienda utilizar 2.5 g de cutícula de camarón y 100 ml de medio base. La especie que produjo mayor peso seco y menor número de esporas fue *Beauveria bassiana*. Un comportamiento inverso lo mostró *Paecilomyces fumosoroseus*, quien produjo menor peso seco y logró un mayor número de esporas. El mayor número de esporas en cualquiera de las tres especies se observó con la formulación de 100 ml de medio base, 0.5 g de harina de soya, 2.0 g de quitina, concha brescal y cutícula de camarón, según fuera el caso, debiendo considerar en primer término al que contiene concha brescal. Resultados del presente

estudio comprueban la factibilidad de producir un medio de cultivo para la producción de biomasa y estructuras infectivas de hongos entomopatógenos a bajo costo.

LITERATURA CITADA

- Berlanga, P. A. M. 1997. Aislamiento, Identificación y Conservación de Hongos Entomopatógenos. En: Memoria de II Curso - Taller de Producción Masiva de Agentes de Control Microbiano. Tecomán Col. 9 - 11 de abril. CNRCB-DGSV-SAGAR.
- Bidochka, J. M. and G.G. Kachaturians. 1991. Growth of the Entomophatogenic Fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 34:345-352.
- Hegedus, D. D.; Bidochka. M. J. and G.G. Khachatourians. 1990. *Beauveria bassiana* Submerged Conidia Production in a Defined Medium Containing Chitin, Two Hexamines or Glucose. *Appl. Microbiol. Biotech.* 33:641-647.
- Jackson, M. A.; McGuire, M. R., Lacey, L. A. and S. P. Wraight. 1996. Liquid Culture Production of Desiccation Tolerant Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 100:270-279.
- Maddox, J. V. 1990. Uso de Patógenos de Insectos en el Manejo de Plagas. En: Introducción al Manejo de Plagas de Insectos. Edit. Limusa. México, D. F.
- Smith, R. J. and E.A. Grula. 1981. Nutritional Requirements for Conidial Germination and Hyphal Growth on *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 37:222-230.
- Stainer, R. Y.; Adelberg, E. A., Ingraham, J. L. and M.L. Wheelis. 1979.

Introduction to the Microbial World. Edit
by Prentice-Hall, Inc. New Jersey. USA.

Willis, H. J. 1987. Cuticular Proteins:
Neglected Components. *Arch. Insect
Biochem. Physiol.* 6:203-215.