SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN | SAGARPA

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
Senasica

Dirección General de Sanidad Vegetal

Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria
Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

FICHA TÉCNICA **CB-23**

C0NSERVACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN GEL DE SÍLICE

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos se conservan generalmente por transferencias frecuentes en medio de cultivo. Este método es utilizado en México, por los laboratorios de producción masiva de agentes de control microbiano. Algunos de los problemas asociados con este método son que los cultivos tienen un corto periodo de vida y son susceptibles a contaminaciones, además con el continuo traspase por medios nutritivos los hongos pueden sufrir cambios morfológicos y genéticos (Heckly 1978, Humber 1997).

Una amplia variedad de técnicas se han desarrollado para la conservación de microorganismos, las cuales tienen sus ventajas y desventajas; la selección de la técnica más apropiada tendrá que ser definida con base en las necesidades específicas de los aislados y de su uso en particular.

La técnica de gel de sílice se considera como una buena opción para los laboratorios que se dedican a la producción masiva de hongos entomopatógenos, por ser una técnica de conservación a largo plazo, sencilla, que no requiere de equipo específico y sobre todo preserva la viabilidad y pureza del aislamiento, además conserva sus características morfológicas, genéticas y su patogenicidad (Anónimo 1993).

TÉCNICA DE GEL DE SÍLICE

1. Preparación del sílice

Los cristales de gel de sílice que se utilizan para la conservación de hongos entomopatógenos deben ser lo suficientemente grandes, entre 6 (3.45 mm) y 22 (0.89 mm) mallas (Smith 1984), grado 40 (Humber 1997) y sin indicador, ya que cuando es hidratado éste, puede ser tóxico a los hongos (Anónimo 1993, Humber 1997).

Se utilizan tubos viales, con tapa de plástico esterilizable, se les agrega 2.5 mm de gel de sílice o se llenan hasta una tercera parte del tubo, se sustituye la tapa de plástico por tapón de algodón (Figura 1); este material es esterilizado en un horno o estufa eléctrica a una temperatura de 180°C por un periodo de 1-6 horas (Figura 2).

Figura 1. Preparación de viales con gel de sílice y tapones de plástico.

Los tapones envueltos en papel aluminio, se esterilizan por separado en autoclave a 121°C por 15 minutos, y se secan en el horno después de la esterilización (Anónimo 1993).

Figura 2. Esterilización de gel de sílice a 180°C por 1-6 horas en estufa eléctrica.

El siguiente paso es esperar a que los tubos se enfríen para cambiarles los tapones de algodón por los de plástico, mismos que deben estar esterilizados y secos para evitar que el gel de sílice absorba humedad; el cambio de tapones se debe realizar en la cámara de flujo laminar o en una área estéril, posteriormente se

mantienen a temperatura ambiente (Anónimo 1993) o son colocados en un desecador a 37°C (Smith 1984).

2. Medio para suspensión

Se prepara una solución de leche descremada al 5-7%, generalmente 5 a 7g en 100 ml de agua destilada y se esteriliza inmediatamente a 121°C por 5 minutos. La solución debe enfriarse a 4°C y se mantiene a esa temperatura hasta que vaya a ser utilizada (Anónimo 1993, Humber 1997).

3. Suspensión de conidios

Para realizar la suspensión de conidios, se requiere trabajar en una área estéril; en el cultivo con el hongo esporulado se agrega la leche estéril fría y con ayuda de una asa bacteriológica al rojo vivo y enfriada sobre medio de cultivo estéril, se separan los conidios del hongo del medio de cultivo hasta obtener una suspensión de esporas, la cual se deposita en un tubo por separado.

4. Dosificación y secado

En la camára de flujo laminar se colocan los tubos con gel de sílice en un recipiente con hielo para mantenerlo frío, ésto debido a que al contacto del gel de sílice con agua o culquier suspensión acuosa provoca una reacción exotérmica, que puede ocasionar la muerte de las estructuras del hongo (Humber 1997); por lo anterior es necesario adicionar la suspensión de conidios con una pipeta o pipetiador gota a gota.

La suspensión que se agrega debe ser la cantidad que absorbe el gel de sílice; si en los tubos se depositó 2.5 mm de gel, será de 1 ml la suspensión de conidios que se agregará, y si se llenaron con gel hasta una tercera parte del tubo, se agrega la cantidad que moje 3 cuartas partes del gel para evitar la sobresaturación (Figura 3). Si se llegan a formar burbujas en el gel de sílice, se eliminan con una varilla de vidrio previamente esterilizada o golpeando el tubo sobre la cámara de siembra; después de agregar la suspensión, los frascos se mantienen en el hielo por 20 minutos o hasta que el hielo se derrita un poco (Anónimo 1993).

Los cristales son agitados para homogeneizar la suspensión en el gel. Los frascos se mantienen a 25°C hasta que los cristales se separan fácilmente al ser agitados o hasta que la suspensión haya sido absorbida y que los cristales estén completamente sueltos; ésto ocurre generalmente después de una o dos semanas.

Figura 3. Tubos con gel de sílice y la cantidad necesaria de la suspensión de conidios para su conservación.

5. Viabilidad

La viabilidad del material se determina antes de almacenar los tubos, para lo cual se colocan varios cristales de gel de sílice en medio de cultivo, utilizando medios básicos para el crecimiento de hongos como agar de dextrosa y papa, agar de dextrosa sabouraud o agar nuritivo; el crecimiento del hongo en cada cristal se debe observar a partir del segundo día después de la siembra; si el crecimiento es satisfactorio, los tapones de rosca son colocados en los tubos y éstos son etiquetados y almacenados a una temperatura constante entre 4 y -4°C (Figura 4).

Figura 4. Conservación de *Metarhizium ansiopliae* en gel de sílice listos para almacenar.

6. Almacenamiento y sobrevivencia

Los hongos almacenados bajo esta técnica pueden permanecer viables por más de diez años, es una técnica segura para muchos hongos (Cuadro 1.) La conservación en gel de sílice no es recomendable para microorganismos con volumen vacuolar o citoplásmico grande, como es el caso de hongos de las divisiones Mastigomycotina y Zygomycotina dentro de la cual se ubican los Entomophthorales (Smith y Onions 1983, Humber 1997). Los hongos entomopatógenos que se utilizan como agentes de control microbiano se ubican como Hyphomycetes y éstos se conservan favorablemente bajo esta técnica.

El gel de sílice es una técnica en donde se recomienda almacenar el material procesado a diferentes temperaturas; por ejemplo, Humber (1997) recomienda refrigerar a -20°C; por otra parte Smith y Onions (1983) consideran que 4°C es la temperatura aceptable para su almacenamiento, ya que la posibilidad de almacenar los hongos en gel de sílice a temperatura ambiente implica el riesgo de una decreciente pérdida de viabilidad.

Cuadro 1. Viabilidad de especies procesadas en gel de sílice de 1971 a 1982. (Tomado de Smith y Onions 1983)

	Especies evaluadas	Viables	% viabilidad
Mastigomycotina			
Chytridiomycetes	5	0	0
Oomycetes	5	0	0
Zygomycotina			
Zygomycetes	34	20	59
Ascomycotina	78	53	68
Basidiomycotina	20	10	50
Deuteromycotina			
Hyphomycetes	250	202	81
Coelomycetes	28	21	75

La suma de la viabilidad evaluada de 1971 a 1982.

Especies evaluadas	Muerte en almacenamiento	Exitos	% viabilidad
420	114	306	73%

RECUPERACIÓN DE MATERIAL

La recuperación de conidios de hongos para su uso en la producción masiva, se realiza sembrando cristales de gel de sílice sobre medios de cultivo; después de la siembra, el material se debe mantener a 27°C hasta que esporule (Smith y Onions 1983).

VENTAJAS

- Es barato y simple.
- No requiere equipo costoso.
- Los cultivos son muy estables con esta técnica.
- Si hay contaminación por ácaros, éstos no sobreviven a las condiciones secas del medio.
- Se puede obtener inóculo por varias ocasiones de un mismo tubo.

DESVENTAJAS

- La técnica es para hongos esporulantes.
- Posibilidades de introducir contaminantes en recuperaciones constantes.

LITERATURA CITADA

Anónimo. 1993. Taxonomía y conservación de levaduras y su aplicación en biotecnología. Manual de Laboratorio. Colección de Cultivos Microbianos. CINVESTAV-CIATES. México.

Heckly, R.J. 1978. Preservation of microorganisms, p. 1-53. *In*: Perlaman, D. (ed.). Advances in applied microbiology. Vol. 24 Academic Press Inc.

Humber, R.A. 1997. Fungi: preservation of cultures, p. 269-279. *In*: Lacey, L. (ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic press. San Diego, California. 409 p.

Jenkins, N.E. & D. Grzywacz. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents assorance of product performance. Biocontrol Science and Technology 10: 753-777.

Smith, D. 1984. Maintenance of fungi, p. 83-107. *In*: Ekirsop, B. & J.J.S. Snell (eds.). Mantenance of microorganisms a manual of laboratory methods. Academic Press Inc. London.

Smith, D. & A.A.S Onions 1983. The preservation and maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute. England. 50 p.

Snell, J.J.S. 1984. General introduction of maintenance methods, p. 11-19. *In*: Ekirsop, B. & J.J.S. Snell (eds.). Maintenance of microorganisms a manual of laboratory methods. Academic Press Inc. London.

AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Hugo César Arredondo Bernal, Ing. Pedro Pérez Serrato e Ing. Marco Antonio Mellín Rosas, por su apoyo en la revisión de esta publicación.

C. Javier Usabiaga Arroyo
SECRETARIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN
Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga
DIRECTOR EN JEFE DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA
Dr. Jorge Hernández Baeza
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
Dr. Juan Pablo Martínez Soriano
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
M.C. Hugo César Arredondo Bernal
SUBDIRECTOR DE CONTROL BIOLÓGICO

Autores:
M.C. Angélica María Berlanga Padilla
M.C. Víctor Manuel Hernández Velázquez

SUBDIRECCIÓN
DE CONTROL BIOLÓGICO
KM. 1.5 CARRETERA TECOMÁN-ESTACIÓN FFCC. A.P. 133
TECOMÁN, COL. C.P. 28120
TEL. (313) 32 4 07 45
FAX (313) 32 4 27 73
cnrcb@volcan.ucol.mx
Año 2003