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

Senasica | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

FICHA TÉCNICA **CB-27**

Cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos

Dirección General de Sanidad Vegetal

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

INTRODUCCIÓN

Los aislados de hongos entomopatógenos colectados en campo tienen información genética heterogénea, lo que puede dar lugar a variaciones celulares que implican cambios en las propiedades físicas, fisiológicas y bioquímicas (Estrada *et al*. 1997, Jenkins *et al*. 1998, Cortez-Madrigal *et al*. 2003). Por lo tanto, después de haber seleccionado un aislado o aislados virulentos para el desarrollo de un micoinsecticida, el siguiente paso es la obtención de cultivos monospóricos (Jenkins *et al*. 1998) que permite contar con aislados genéticamente homogéneos, con una mayor estabilidad en todas sus propiedades.

En estudios previos se ha comprobado que los cultivos monospóricos presentan características mejoradas, en comparación a sus respectivos multiespóricos, en la germinación, la tasa de crecimiento, la producción de propágulos en medio sólido y líquido, la producción de proteasas y la virulencia, todas estas variables consideradas como factores de virulencia (Giraldo *et al*. 2001, Cortez-Madrigal *et al*. 2003, Ayala-Zermeño *et al*. 2005, Castellanos-Moguel *et al*. 2007, Castellanos-Moguel *et al*. 2008, Toriello *et al*. 2008, Khachatourians y Qazi, 2008, Montesinos-Matías *et al*. 2011). Asimismo, el trabajo de investigación con cultivos monospóricos permite que los resultados obtenidos entre diferentes grupos de trabajo sean reproducibles (Strobel *et al*. 1996). La selección basada en la evaluación de factores de virulencia permite la selección de un solo aislado monospórico. Tanto el aislado multiespórico, como el resto de los cultivos monospóricos deberán ser almacenados de manera segura utilizando las técnicas de conservación para hongos a largo plazo (Jenkins *et al*. 1998, Humber 1997).

La obtención de cultivos monospóricos se realiza con algunos métodos descritos, como el de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), pero este método no garantiza que cada UFC proceda de un solo conidio (Goettel e Inglis 1997). El método que se describe a continuación es aplicable para la mayoría de los hongos, con excepción de aquellos que no germinan en medios artificiales.

OBTENCIÓN DE AISLADOS MONOSPÓRICOS

1.- Cultivar los hongos en tubos con agar Dextrosa Sabouraud suplementado con Extracto de Levadura al 0.2% (SDAY), a 28°C hasta alcanzar una esporulación óptima.
2.- Preparar una suspensión de conidios en Tween 80 al 0.05% y cuantificar en una cámara de Neubauer, hasta obtener una suspensión de 1 x 10^3 conidios/mL.
3.- Preparar cajas de Petri con 10 mL de agar SDAY. Como alternativa se puede utilizar agarosa al 0.8% para el caso de hongos con conidios pequeños (p. ej. *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & W. Gams).
4.- Colocar 50 microlitros de esta suspensión de conidios en el centro de las cajas de Petri y esparcir con una varilla de vidrio estéril.
5.- Realizar la siembra por cuadruplicado e incubar a 28 ± 1°C.
6.- Monitorear el cultivo a partir de las 12 h de incubación con el objetivo de 10x (Fig. 1) de un microscopio óptico.

Figura 1. Conidio germinado de *Isaria fumosorosea* Wize entre 18 y 19 h después de haber sido sembrado en agar de Sabouraud (40x).

7.- Localizar un conidio germinado y verificar con el objetivo de 40x.
8.- Regresar al objetivo de 10x y ubicar el conidio en el centro del campo visual.
9.- Bajar el revólver del microscopio, cerrar el diafragma hasta que solamente se observe un pequeño haz de luz sobre la región donde se localizó el conidio (un área de 2 mm^2

aproximadamente) (Goettel e Inglis 1997, Mier *et al*. 2002).

10.- Realizar pequeños cortes con una aguja de disección de manera que se forme un cuadro (área de 2 mm^2 aproximadamente) en torno a la circunferencia del haz de luz.

11.- Observar nuevamente con los objetivos de 10x y 40x para verificar que el área donde se hizo el corte contenga un solo conidio.

Figura 2. Asa fina plana.

12.- Tomar la fracción de agar con el conidio germinado con un asa fina plana y colocarlo en una caja de Petri o tubo con medio SDAY inclinado.

13.- Incubar a 28°C.

14.- Transcurridas 72 h realizar las observaciones a 4x para asegurar que el crecimiento es originado de un solo conidio y que esté libre de contaminación (Fig. 3).

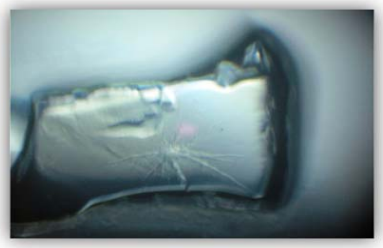

Figura 3. Conidio germinado de *Isaria fumosorosea* Wize a las 96 h, al interior de un tubo con agar inclinado (4x).

15.- Una vez que se han obtenido las colonias (Fig. 4), realizar la conservación siguiendo cualquiera de los métodos descritos para hongos entomopatógenos (Humber 1997).

Figura 4. Cultivo multiespórico del hongo entomopatógeno *Metarhizium acridum* [(Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber (2009)] con sus respectivos monospóricos.

16.- Realizar la caracterización fenotípica, producción de enzimas y bioensayos de variables considerados como «factores de virulencia» (Khachatourians y Qazi 2008) de la colección de monospóricos con su respectivo multiespórico, siguiendo metodologías ya reportadas.

VENTAJAS

Los cultivos monospóricos garantizan la calidad del aislado, y se asegura su potencial como micoinsecticida (Jenkins *et al.* 1998, Cortez-Madrigal *et al*. 2003); además se certifica que el aislado está libre de contaminación (excluyendo los micovirus). Es un método sencillo, barato y eficaz.

DESVENTAJAS

Durante la obtención de los cultivos monospóricos hay posibilidades de contaminación con bacterias y otros contaminantes, en el caso de las primeras se reduce al adicionar al medio de cultivo 0.5 g/L de cloranfenicol (Choi *et al*. 1999). Por otro lado, para el caso de otros microorganismos contaminantes se pueden utilizar substancias como el fungicida dodine a una dosis de 10-50 µg

por mililitro, esta dosis puede reducir los contaminantes por encima del 90% (Liu *et al*., 2003). Este fungicida también puede ser utilizado a dosis bajas (10 µg/mL) en combinación con antibióticos como la ciclohexamida a una dosis de 500 µg/mL (Inglish *et al*, 2012). Las dosis antes mencionadas han sido utilizadas para aislar principalmente hongos entomopatógenos de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* spp. El uso de otros fungicidas como el tiabendazol (4 mg/L), han mostrado un alto grado de inhibición de contaminantes para el aislamiento de hongos entomopatógenos como *Beauveria brogniartii* (Saccardo), *Hirsutella thompsonii* Fisher, *Metarhizium anisoliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Nomuraea rileyii* (Farlow) Samson e *Isaria* spp. entre otros (Luz *et al*., 2007).

LITERATURA CITADA

Ayala-Zermeño M.A., T. Mier, J. Sánchez Robles, C. Toriello. 2005. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. Revista Mexicana de Micología 20: 93-97.

Castellanos-Moguel J., M. González-Barajas, T. Mier. M.R. Reyes-Montes, E. Aranda, C. Toriello. 2007. Virulence testing and extracellular (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). Revista Iberoamericana de Micología 24: 62-68.

Castellanos-Moguel J., R. Cruz-Camarillo, E. Aranda, T. Mier, C. Toriello. 2008. Relationship between protease and chitinase activity and the virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Revista Mexicana de Micología 28: 71-80.

Choi Y.W., K.D. Hyde, W.H. Ho. 1999. Single spore isolation of fungi. Fungal. Diversity 3: 29-38.

Cortez-Madrigal H., R. Alatorre-Rosas, G. Mora-Aguilera, H. Bravo-Mojica, C.F. Ortiz-García, L.A. Aceves-Navarro. 2003. Characterization of multisporic and monosporic isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. BioControl 48**:** 321–334.

Estrada–Valencia M.N., P.E. Vélez–Arango, E.C. Montoya–Restrepo.1997. Caracterización de cultivos monoespóricos del hongo *Beauveria bassiana*. Cenicafé 48(4): 217–224.

Giraldo-Cardozo E.M., F.Y. López, B.F. Delgado, A.P.E. Vélez. 2001. Actividad lipolítica y proteolítica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y su relación con la patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Revista Colombiana de Entomología 27: (1-2): 61-65.

Goettel M.S., G.D. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. pp. 213-248. *In*: Lacey L.A. (Ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. Chapter V-3. Academic Press, London.

Humber R.A. 1997. Fungi: preservation of cultures. pp. 269-279. *In*: Lacey, L.A. (Ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London.

Inglis G.D., J. Enkerli, M.S. Goettel. 2012. Laboratory Techniques Used for Entomopathogenic Fungi: Hypocreales. pp. 189-253. *In*: Lacey L.A. (Ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. 2da. Edición, Chapter VII. Academic Press, London.

Jenkins N.E., G. Heviefo, J. Langewald, A.J. Cherry, C.J. Lomer. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information 19: 21N-31N.

Khachatourians G.G., S.S. Qazi. 2008. Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology. pp. 33-61, 57-66. *In*: Brakhage A.A., Zipfel P.F. (Eds.). Human and Animal Relationships. The Mycota. Springer Berlin Heidelberg. Vol. 6.

Liu ZY; R.J. Milner, C.F. McRae, G.G. Lutton. 1993. The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil. Journal of Invertebrate Pathology. 62: 248-251.

Luz C., M.B.C. Netto, L.F.N. Rocha. 2007. In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi. Mycopathologia. 164: 39-47.

Montesinos-Matías R., G. Viniegra-González, R. Alatorre-Rosas, O. Loera. 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-d-glucoseresistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27:2095-2102

Strobel G.A., X. Yang, J. Sears, R.S. Kramer, W.M. Hess. 1996. Taxol from *Pestafotiopsis microspora,* and endophytic fungus of *Taxus waflachiana.* Microbiology 142: 435-440.

Toriello C., E. Montoya-Sansón, M. Zavala-Ramírez, H. Navarro-Barranco, D. Basilio-Hernández, V. Hernández-Velázquez, T. Mier. 2008. Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). Revista Mexicana de Micología 28: 57-66.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Marco Antonio Mellín Rosas, al M. en C. Hugo César Arredondo Bernal y al Dr. Octavio Loera Corral por su apoyo en la revisión de esta publicación.

C. Francisco Javier Mayorga Castañeda
SECRETARIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN
Ignacio Rivera Rodríguez
SUBSECRETARIO DE DESARROLLO RURAL
Dr. Francisco Javier Trujillo
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
M. en C. José Abel López Buenfil
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
M. en C. Hugo César Arredondo Bernal
SUBDIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE CONTROL BIOLÓGICO

Autores:
Dr. Miguel Angel Ayala-Zermeño
Dr. Roberto Montesinos-Matías
M. en C. Angélica Berlanga-Padilla

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
senasicatec@prodigy.net.mx
Año 2012

SUGERENCIA DE COMO CITAR ESTA FICHA

Ayala-Zermeño M.A., R. Montesinos-Matías, A. Berlanga-Padilla. 2012. Obtención de cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-27, 4 p