



FICHA TÉCNICA **CB-29**

CULTIVOS MONOSPÓRICOS DE HONGOS ENMTOMOPATÓGENOS

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
DEPARTAMENTO 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 & 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 & 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 1×10^3 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. *Akanthomyces lecanii* (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha).
- 4.- Colocar 50 μ L de esta suspensión de conidios en el centro de las cajas de Petri y dispersar con una varilla de vidrio estéril.
- 5.- Realizar la siembra por cuadruplicado e incubar a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 6.- Monitorear el cultivo a partir de las 12 h con el objetivo de 10 \times (**Fig. 1**) de un microscopio óptico.
- 7.- Localizar un conidio germinado y verificar con el objetivo de 40 \times .
- 8.- Regresar al objetivo de 10 \times 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 mm² aproximadamente) (Goettel & Inglis 1997, Mier et al. 2002).



Figura 1. Conidio germinado de un hongo entomopatógeno entre 18 y 19 h después de haber sido sembrado en agar de Sabouraud (40×).

10.- Realizar pequeños cortes con una aguja de disección de manera que se forme un cuadro (área de 2 mm² aproximadamente) en torno a la circunferencia del haz de luz.

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

12.- Tomar la fracción de agar con el conidio germinado con un asa fina plana (**Fig. 2**) y colocarlo en una caja de Petri o tubo con medio SDAY inclinado e incubar a 28°C.

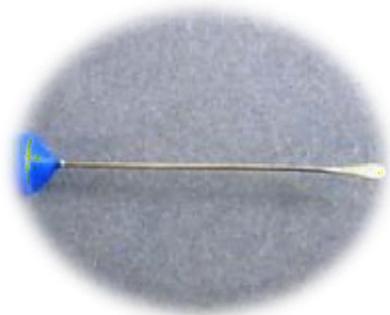


Figura 2. Asa fina plana.

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

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



Figura 3. Conidio germinado de *Cordyceps fumosorosea* (Wize) Kepler, B. Shrestha & Spatafora a las 96 h, al interior de un tubo con agar inclinado (4×).

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



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

16.- Realizar la caracterización fenotípica, producción de enzimas y bioensayos de variables considerados como «factores de virulencia» (Khachatourians & 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 (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 levaduras, en el caso de las primeras se reduce al adicionar al medio de cultivo 0.5 g/L de cloranfenicol (Choi et al. 1999).

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. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88302014>
- 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. DOI: 10.1016/s1130-1406(07)70016-5
- 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. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v28nsp/v28nsp/ea9.pdf>
- Choi Y.W., K.D. Hyde & W.H. Ho. 1999.** Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29-38. <http://hdl.handle.net/10722/223404>
- Cortez-Madrigal H., R. Alatorre-Rosas, G. Mora-Aguilera, H. Bravo-Mojica, C.F. Ortiz-García & L.A. Aceves Navarro. 2003.** Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *BioControl* 48: 321-334. <https://doi.org/10.1023/A:1023663629826>
- 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. <https://www.redalyc.org/pdf/883/88319884002.pdf>
- 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. & D. Inglis. 1997.** Fungi: Hyphomycetes. 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. In: Lacey, L.A. (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic press.
- Jenkins N.E., G. Heviefio, 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. In: Brakhage A.A., Zipfel P.F. (Eds.). *Human and Animal Relationships*. The Mycota. Springer Berlin Heidelberg. Vol. 6.
- Montesinos-Matías R., G. Viniestra-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 <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0672-z>

-
- Mier T., C. Toriello & M. Ulloa. 2002.** Métodos para aislamiento, purificación y obtención de microcultivos de hongos microscópicos. In: Hongos Microscópicos Saprobios y Parásitos: Métodos de Laboratorio. UAM-Xochimilco, UNAM-Instituto de Biología. México D.F. 35 p.
- Strobel G.A., X. Yang, J. Sears, R.S. Kramer & W.M. Hess. 1996.** Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, and endophytic fungus of *Taxus waflichiana*. Microbiology 142: 435-440. 10.1099/13500872-142-2-435
- 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.<https://www.redalyc.org/pdf/883/88319381007.pdf>

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

Dr. Víctor Manuel Villalobos Arámbula
SECRETARIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL
Dr. Francisco Javier Calderón Elizalde
DIRECTOR EN JEFE DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA
Ing. Francisco Ramírez y Ramírez
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
M.C. Guillermo Santiago Martínez
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
M.C. Jorge Antonio Sánchez González
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO

Elaboró:

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

DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO KM 1.5
CARRETERA TECOMÁN-ESTACIÓN FFCC. C.P. 28110
TECOMÁN, COLIMA.

TEL. (313) 32 4 07 41 y 45

<https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/centro-nacional-de-referencia-de-control-biologico-103097>

Sugerencia de como citar esta ficha:

Ayala-Zermeño M.A., R. Montesinos-Matías, A.M. Berlanga-Padilla. 2023. Obtención de cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos. Departamento de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-29, 4 p.