

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA INDUCIR ESPORULACIÓN DE *Isaria tenuipes* PECK

Sandra Maritza Castro-Pérez*, **Robinson González-Marín***,
Jairo Castaño-Zapata** y **Tatiana Sanjuán*****

* Ingenieros Agrónomos, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. Correos electrónicos: castro_maritza@yahoo.com, robinson_83@yahoo.com

** Ph.D. Profesor Titular, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. Correo electrónico: jairo.castaño_z@ucaldas.edu.co

*** Candidata a Doctora en Ciencias. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Correo electrónico: t_sanjuan@hotmail.com

Recibido: 15 de octubre; aprobado: 25 de enero de 2013

RESUMEN

Isaria tenuipes es un hongo entomopatógeno que parasita varias familias del orden Lepidoptera. Se ha descrito como un hongo multi-infeccioso que ataca todas las etapas de muchos grupos de insectos, motivo por el cual es considerado como un agente promisorio para el control biológico. Su cultivo se ha enfocado principalmente en la producción de cuerpos fructíferos por poseer propiedades farmacológicas, sin embargo, los reportes de métodos de cultivo con el propósito de evaluar su acción entomopatógena han sido pocos. Con el fin de determinar el método más efectivo para la producción de conidios de *I. tenuipes*, se evaluaron diferentes medios de cultivo como: Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Malta-Agar (MA), Extracto de levadura-Peptona-Glucosa (YPG) y YPG enriquecido con integumento de *Cosmopolites sordidus*, cada uno con diez repeticiones en un diseño completamente al azar. Se realizaron evaluaciones cada cinco días, durante 60 días. Las variables evaluadas fueron: días a producción de sinemas, días a esporulación y producción total de conidios. En PDA, no se obtuvo formación ni de sinemas ni de conidios. La mayor producción de conidios se obtuvo en YPG + Integumento de *C. sordidus* con una producción promedio de $1,9 \times 10^6$ conidios/mL de agua.

Palabras clave: conidios, *Cosmopolites sordidus*, integumento, sinemas.

ABSTRACT

EVALUATION OF CULTURE MEDIA TO INDUCE SPORULATION OF *Isaria tenuipes* PECK

Isaria tenuipes is a parasite fungus of several species of the Lepidoptera order. It has been described as a multi infectious fungus that attacks all the development stages of many groups of insects, for this reason is considered as a promising agent in biological control. Its cultivation has been mainly oriented towards the production of fructiferous bodies due to its pharmacological properties, however, the reports of cultivation's methods to evaluate its entomological action, are scarce. With the objective to determine the most effective method to produce conidia of *I. tenuipes*, it was evaluated different media, such as: Potato-Dextrose-Agar (PDA), Malt-Agar (MA), Yeast extract-Peptone-Glucose (YPG) and YPG + integument of *Cosmopolites sordidus*, each one with 10 replications in a completely randomized design. The evaluations were carried out every five days, during 60 days. Was evaluated the variables: days to production of synnemata, days to sporulation and total production of conidia. On PDA was not obtained production neither synnemata nor conidia. The best media for the variables evaluated was YPG + Integument of *C. sordidus*, producing an average of 1.9×10^6 conidia/mL of water.

Key words: conidia, *Cosmopolites sordidus*, integument, synnemata.

INTRODUCCIÓN

Uno de los géneros más importantes dentro de los hongos entomopatógenos es *Paecilomyces*, que comprende una gran número de especies, dentro de las cuales las más conocidas son: *P. fumosoroseus* (Wize) A.H.S.Br. & G. Sm., *P. lilacinus* (Thom) Luangsa-Ard, Hou-Braken, Hywel-Jones & Samson y *Paecilomyces* (= *Isaria*) *tenuipes* (Peck) Samson, entre otros (Samson, 1974).

Paecilomyces es un hongo con una ecología compleja que puede usar como sustrato materia muerta, plantas, artrópodos, moluscos e incluso el cuerpo humano. Samson (1974) dividió al género en dos grupos: de acuerdo al sustrato y a las condiciones de temperatura en que se desarrollan. Denominó sección *Paecilomyces* a las especies termófilas que crecían en diversos sustratos, sin incluir insectos; entre esas especies se encuentran *P. marquandii* (Masse) S. Hughes y *P. variotii* Banier. Incluyó en la sección *Isarioidea* a las especies mesófilas que parasitan insectos como: *P. tenuipes*, *P. cicadae* Samson y *P. lilacinus*, entre otras. Luangsa-Ard *et al.* (2004), realizaron un análisis filogenético con datos moleculares y encontraron congruencia con la propuesta de Samson (1974), pero decidieron rescatar el nombre genérico de *P. tenuipes* y retomar el uso del género *Isaria*. Por consiguiente, actualmente es válida la especie *I. tenuipes* (Luangsa-Ard *et al.*, 2004), la cual se ubica en la familia Cordycipitaceae, existiendo una relación directa anamorfo-teleomorfo con *Cordyceps takaomontana* Yakush. & Kumaz (Sung *et al.*, 2007).

En la patente publicada por Shimizu *et al.* (2005), se reporta el efecto de la cepa *P. tenuipes* T1 FERM

BP 7861 sobre insectos de los órdenes Lepidoptera, Hemiptera, Díptera, Thysanoptera e Isóptera.

Aunque se reconoce el potencial de este hongo como agente de control biológico, hasta el momento no se ha logrado establecer ampliamente su uso en programas de protección fitosanitaria, por lo que se hace necesario optimizar y estandarizar los protocolos para su cultivo y reproducción. Por tal razón, el objetivo de este estudio fue evaluar el desarrollo de *I. tenuipes* 902 en cuatro medios de cultivo: Extracto-Malta-Agar (MA), Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Extracto de lavadura-Peptona-Glucosa (YPG) y YPG enriquecido con integumento de *Cosmopolites sordidus* Germar.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo bajo condiciones controladas en los laboratorios de Control de Calidad de Bioinsumos del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Reserva Plan-Alto y de Fitopatología de la Universidad de Caldas.

La cepa *Isaria tenuipes* T. Sanjuan 902 fue aislada e identificada por Tatiana Sanjuán, de pupas del orden Lepidoptera de la familia Noctuidae en el Parque Natural Chicaque (Cundinamarca, Colombia), ubicado a 2500 msnm.

Los medios y procedimientos utilizados para inducir esporulación de *I. tenuipes* 902, se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para inducir esporulación de *I. tenuipes* 902

Medio	Formulación	Siembra e incubación
Papa-Dextrosa-Agar (PDA)	39 g de PDA por cada 1000 mL de agua destilada.	Se incubó a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (WTB binder) por 20 días. Cuando el hongo colonizó entre 90% y 100% de la caja Petri, se llevó a temperatura ambiente ($\pm 18^{\circ}\text{C}$) para estimular la formación de sinemas y esporulación.
Fermentación sólida de Malta-Agar (MA)	65 g de MA por cada 1000 mL de agua destilada.	
Extracto de levadura-Peptona-Glucosa (YPG)	Extracto de levadura (10 g/L), peptona (10 g/L), glucosa (20 g/L) y estreptomicina (0,1 g/L). YPG + 10g/L de integumento de <i>C. sordidus</i> .	Después de la esterilización se vertieron 30 mL en frascos de vidrio de 4 x 11 cm. Se incubaron en agitación orbital a 100 rpm a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. Finalmente se trasladó a un cuarto de incubación a 20°C sin agitación.
Fermentación líquida de YPG + Integumento de <i>Cosmopolites sordidus</i>	Para la obtención del integumento los insectos se congelaron a $-15^{\circ}\text{C}/1\text{h}$. Se deshidrataron en una plancha de calentamiento y se licuaron por 5 min. El producto del licuado fue pesado y adicionado al medio de cultivo.	

Determinación de concentración de conidios:

se adicionaron 20 mL de agua destilada estéril + Tween 80 al 1% a todo el contenido de las colonias y se realizó un raspado con un asa de punta redonda esterilizada a la superficie micelial; a partir de esa suspensión, se realizó el recuento de conidios en un hemocitómetro, marca Reichert. Para cada repetición se hicieron cuatro lecturas. Se realizaron evaluaciones cada 5 días durante 60 días, con el fin de determinar el tiempo de formación de sinemas y el tiempo de esporulación.

Diseño estadístico: se aplicó un diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos y diez repeticiones. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey, utilizando el software estadístico SAS versión 5,0 y con $\alpha = 0,05$; determinando las diferencias significativas entre los medios. Para este análisis se omitieron los valores cuyas repeticiones no presentaron producción de sinemas ni de esporas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los cuatro medios de cultivo evaluados, se observó una estimulación de crecimiento micelial, pero un retraso en la producción de sinemas a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, por lo cual se consideró reducir la temperatura a 20°C después de obtener una colonización del medio entre 80 y 90%. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas. En la Tabla 2 se muestra el promedio de días necesarios para lograr producción de sinemas de *I. tenuipes* 902 en los cuatro medios de cultivo, observándose una disminución significativa en días a producción de sinemas en YPG y YPG + Integumento de *C. sordidus*. En PDA no se obtuvo formación de sinemas ni de conidios. Los medios YPG y YPG + Integumento de *C. sordidus*, mostraron el menor tiempo para la producción de sinemas de 21 y 22 días, respectivamente, presentando una clara diferencia con el medio MA con un promedio de 37 días (Tabla 2).

Tabla 2. Promedio de días a producción de sinemas de *I. tenuipes* 902 en cuatro medios de cultivo

Medio de cultivo	Días a producción de sinemas
MA	37a*
YPG + Integumento de <i>C. sordidus</i>	22b
YPG	21b
PDA	0c

* Promedios con diferente letra denotan diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

En la Tabla 3 se indica el promedio de días a esporulación de *I. tenuipes* 902 en los cuatro medios de cultivo. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los medios evaluados. El menor tiempo para esporulación se logró en YPG +

Integumento de *C. sordidus*, al permitir esporulación en un promedio de 28 días después de la siembra, 17 y 27 días más temprano que en YPG y MA, respectivamente.

Tabla 3. Promedio de días a esporulación de *I. tenuipes* 902 en cuatro medios de cultivo

Medio de cultivo	Días a esporulación
MA	55a*
YPG	45b
YPG + Integumento de <i>C. sordidus</i>	28c
PDA	0d

* Promedios con diferente letra denotan diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

El resultado comparativo del promedio de conidios/ml producidos por *I. tenuipes* 902 en los medios de cultivo se muestra en la Tabla 4. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas, indicando que al menos uno de los tratamientos presentó un valor promedio estadísticamente diferente. La

concentración promedio más alta correspondió al medio YPG + Integumento de *C. sordidus* con $1,9 \times 10^6$ conidios/mL de agua, seguido por los medios YPG y MA con $2,8 \times 10^5$ y $8,9 \times 10^4$ conidios/mL de agua, respectivamente, los cuales fueron estadísticamente iguales (Tabla 4).

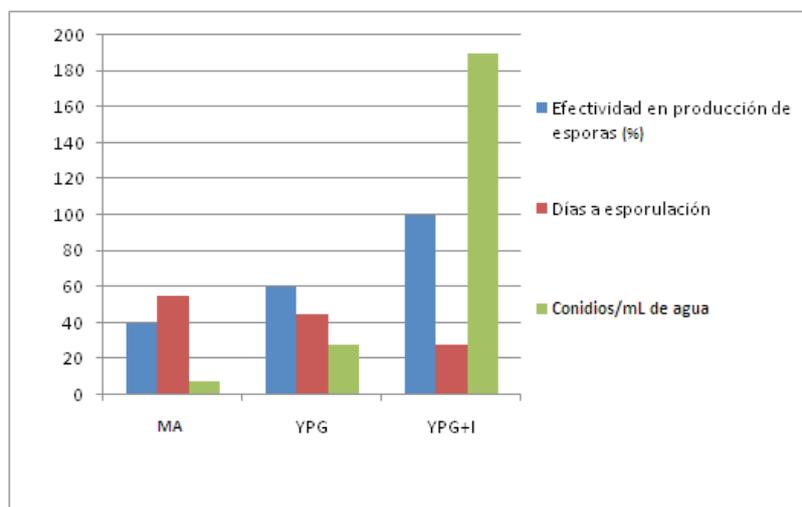
Tabla 4. Producción de conidios de *I. tenuipes* 902/mL de agua en cuatro medios de cultivo

Medio de cultivo	Conidias/mL de agua
YPG + INTEGUMENTO	$1,9 \times 10^6$ a*
YPG	$2,8 \times 10^5$ b
MA	$8,9 \times 10^4$ b
PDA	0c

* Promedios con diferente letra denotan diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Se resalta de esta investigación el medio líquido YPG enriquecido con integumento de *C. sordidus*, por ser el que mostró el mayor porcentaje de efectividad al presentar esporulación en el 100% de las repeticiones,

permitir el menor tiempo para la esporulación de *I. tenuipes* (28 días) y la mayor concentración promedio de conidios ($1,9 \times 10^6$ conidios/mL de agua) (Figura 1).



MA: malta agar, YPG: extracto de levadura+peptona+glucosa, YPG+I: extracto de levadura+peptona+glucosa + Integumento de *C. sordidus*.

Figura 1. Comparación de la efectividad de diferentes medios de cultivo sobre *I. tenuipes* 902, con respecto al tiempo requerido para esporulación y cantidad de conidios producidos/mL de agua.

La respuesta de *I. tenuipes* 902 con el medio YPG + Integumento de *C. sordidus*, es concordante con los resultados de Kang *et al.* (2010), quienes al utilizar un medio a base de cascarilla de arroz, enriquecido con integumento de pupa de Gusano de seda (*Bombix mori* Linnaeus), lograron la esporulación de *I. tenuipes*, 30 días después de la siembra, tiempo muy similar al registrado en esta investigación.

Estos resultados demuestran que el desarrollo de los hongos entomopatógenos es más rápido cuando se utilizan medios enriquecidos con integumento de insectos, lo cual fue demostrado previamente por González *et al.* (2001), quienes observaron que *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., cultivado en medio Sabouraud-dextrosa-agar (SDA) +

Integumento de *Hypothenemus hampei* Ferrari, presentó germinación más rápida y mayor, 24 h después de la incubación a diferencia del medio agar-agar, donde no hubo germinación.

La quitina es un polisacárido acetilado similar a la celulosa, compuesta por N-acetil-D-glucosamina y residuos adicionales de glucosamina, insoluble en agua y de alto peso molecular (Chapman, 1998; Klowden, 2007). Esta molécula presente en el integumento de los insectos debe ser una molécula determinante en la inducción de la esporulación de los hongos entomopatógenos, por lo cual, medios compuestos por quitina sintética o natural deben ser tenidos en consideración al momento de plantear una formulación.

Gao & Liu (2010) señalan que la cantidad de carbono presente en el medio de cultivo, así como la relación carbono-nitrógeno, tienen una gran influencia en los diferentes procesos de desarrollo de los hongos entomopatógenos. Méndez *et al.* (2009) indican que medios ricos, tanto en nitrógeno como en carbono, favorecen la producción de biomasa; sin embargo, se debe considerar que a mayor crecimiento micelial no necesariamente se obtiene una alta producción de conidios como lo observaron Mustafa & Kaur (2009) en sus estudios con *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin y *B. bassiana*. Elósegui (2006) afirma que para inducir el proceso de esporulación en hongos, es necesario que la fuente de carbono del medio de cultivo se encuentre en abundancia y el contenido de nitrógeno sea el factor limitante del crecimiento. Por lo tanto, para lograr mejores resultados en la esporulación de *I. tenuipes* es necesario realizar evaluaciones en la formulación de los medios, variando el porcentaje de participación de las fuentes nutritivas cuando se busca una producción masiva de conidios, siendo este uno de los objetivos más importantes en la producción de hongos entomopatógenos.

Inducir el desarrollo de *I. tenuipes* 902, disminuyendo la temperatura a 20°C, después de un 80% a 90% de

colonización del medio, coincide con los resultados de Kana-Uchi & Fukatsu (1999) y Kang *et al.* (2010), quienes emplearon una temperatura entre 18-20°C para inducir la producción de cuerpos fructíferos de *Isaria tenuipes*.

Los resultados obtenidos en PDA fueron contrarios a los reportados por Shimizu *et al.* (2005), quienes recomiendan el uso de este medio para el cultivo de *I. tenuipes*. PDA es un medio muy rico en fuentes de carbono, como dextrosa, lo que conlleva a que el hongo genere un crecimiento puramente vegetativo, no existiendo un estrés fisiológico que lo induzca a esporular.

CONCLUSIONES

La disminución de la temperatura a 20°C es necesaria para acelerar el proceso de esporulación de *I. tenuipes*.

El uso de una fuente de energía proveniente del integumento de insectos para la formulación de medios de cultivo es importante para acelerar el desarrollo de los hongos entomopatógenos y aumentar la producción de conidios.

REFERENCIAS

- Chapman, R.F. 1998. The insects: structure and function. Cambridge University Press. 770 p.
- Elósegui, O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Ciudad de La Habana, Cuba. 61p.
- Gao, L. & Liu, X. 2010. Effects of carbon concentrations and carbon to nitrogen rations on sporulation of two biological control fungi as determined by different culture methods. *Mycopathologia*. 169:475-481.
- González, M., Valencia, A. & Bustillo, A. 2001. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 60:31-35.
- Kana-Uchi, A. & Fukatsu, T. 1999. Light-induced fruit body formation of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *Mycoscience*. 40:349-351.
- Kang, P.D., Sung, G.B., Kim, K.Y., Kim, M.J., Hong, I.P. & Ha, N.G. 2010. Breeding of a silkworm variety for synnemata production of *Isaria tenuipes*. *Mycobiology*. 38(3):180-103.
- Klowden, M.J. 2007. Physiological systems in insects. Academic Press. 688p.
- Luangsa-Ard, J.J., Hywel-Jones, N.L. & Samson, R.A. 2004. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia*. 96(4):773-780.
- Méndez, A., Del Pozo, E. & García, I. 2009. Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Rev. Protección Vegetal*. 24(3):156-161.
- Mustafa, U. & Kaur, G. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Agricultural Research*. 3(10):922-930.
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*. 6:58-60.
- Shimizu, S., Isayama, S. & Nitta, E. 2005. 2 234 987. Oficina española de patentes y marcas.
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J., Luangsa-Ard, J., Shrestha, B. & Spatafora, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol*. 57(1):5-59.