

NOTA CORTA

CRECIMIENTO Y ESPORULACIÓN DE *Hirsutella thompsonii* EN
MEDIOS NATURALES Y CONSERVACIÓN DE SU VIABILIDAD EN
DIFERENTES SOPORTES

por Teresa Mier,
Fernando Rosete e
Ilia Garibay *

GROWTH AND SPORULATION OF *Hirsutella thompsonii* IN
NATURAL MEDIA AND THE CONSERVATION OF ITS VIABILITY
IN DIFFERENT SUPPORTS

SUMMARY

The hyphomycete acarine pathogen, *Hirsutella thompsonii*, was grown in liquid culture media composed of natural carbon and nitrogen sources contained in wheat bran, potato-carrot, corn meal and corn steep liquor, with or without 0.5 ml of Tween 80 and incubated for 13 days at 26-28°C in a shaker bath at 70 hits/min. Fungal biomass was determined by the mycelium dry weight, and sporulation by number of conidia/ml. Biomass production was higher in wheat bran, and in corn meal media with Tween 80. The higher concentration of conidia (5.5×10^4 conidia/ml) was observed in wheat bran medium without Tween 80. The addition of Tween 80 did not increase the production of conidia. The fungus was stored in straw, wheat bran, sterile distilled water, physiological saline solution, mineral oil or 10% glycerol, and in anhydrous silica gel, at room and refrigeration temperatures. Low temperature was more efficient in maintaining viability during the storage period.

RESUMEN

El hifomicete patógeno de ácaros, *Hirsutella thompsonii*, fue cultivado en medios líquidos obtenidos a partir de salvado de trigo (SAL), papa-zanahoria (PZ), harina de maíz (HM) e infusión de maíz (IM), como fuentes naturales de carbono y nitrógeno, con o sin 0.5 ml de Tween 80, e incubado a 26-28°C con agitación de 70 golpes/min durante 13 días. La biomasa fúngica se estimó por peso seco y la esporulación por el número de conidios/ml. La mayor biomasa se obtuvo en los medios de SAL y HM adicionados con Tween 80. La mayor

* Departamento El Hombre y su Ambiente, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, C.P. 04960 México, D.F.

concentración de conidios (5.5×10^4 conidios/ml) se encontró en el medio SAL sin Tween 80. No se observó el efecto estimulante del Tween 80 sobre la esporogénesis. El hongo fue conservado en paja, salvado de trigo, agua destilada, solución salina fisiológica, aceite mineral, o glicerol al 10%, y en gel de sílice anhidro, a temperaturas ambiente y de refrigeración. La viabilidad del hongo se conservó durante el período de almacenamiento en todos los soportes utilizados y fue favorecida por la temperatura de refrigeración.

Las especies del género Hirsutella se distinguen por ser enemigos naturales de ácaros e insectos que constituyen plagas de repercusión económica en la producción de diversos cultivos (Cabrera, 1977; McCoy, 1981).

En México se ha encontrado H. thompsonii en el ácaro del cocotero, Eryophyes guerreronis (Hall et al., 1980), habiéndose probado su patogenicidad hacia el eriófido (Sampedro y Rosas, 1989). H. thompsonii también ha sido encontrado en Phyllocoptruta oleivora Ashm., el ácaro de los cítricos.

Debido al interés que ha suscitado este hongo como agente potencial para el control biológico de estas plagas, gran parte de los estudios sobre su comportamiento fisiológico se ha realizado con el propósito de determinar la factibilidad de cultivarlo en medios apropiados. En el presente trabajo probamos la influencia de diferentes medios de cultivo con fuentes naturales de carbono y nitrógeno sobre el crecimiento y esporulación del hongo, además de probar la conservación de su viabilidad en diferentes soportes.

La cepa 59 de Hirsutella thompsonii var. thompsonii Fisher fue donada por R.I. Cabrera, quien la aisló en Cuba a partir de Ph. oleivora en cultivos de cítricos. El hongo fue mantenido y cultivado en medios de agar de Sabouraud (Bioxón, México) o en medio H [sacarosa, 10 g/l; dextrosa (Bioxón), 5 g/l; peptona (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, E.U.), 0.5 g/l; extracto de levadura (Difco), 5 g/l; agar (E. Merck, Darmstadt, Alemania), 15 g/l] e incubado a 26-28°C. A partir de cultivos de 10-12 días se tomó un fragmento micelial (0.1 g de peso húmedo equivalente a 0.02 g de peso seco) para inocular matraces de 125 ml conteniendo, por matraz, 75 ml de los siguientes medios de cultivo: medio de salvado de trigo, SAL (salvado de trigo, 150 g/l; dextrosa, 6 g/l); medio de papa-zanahoria, PZ (papa y zanahoria, 50 g/l de cada una, ambas rebanadas, hervidas durante media hora y pasadas por un lienzo fino; peptona, 10 g/l y dextrosa 20 g/l); medio de infusión de maíz, IM (infusión de maíz comercial sin preservadores, 20 ml/l; NaNO_3 , 3 g/l; KH_2PO_4 , 1 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; KCl , 0.5 g/l y FeSO_4 , 0.01 g/l) y medio de harina de maíz, HM (harina de maíz amarillo, 40 g/l; NaNO_3 , 3 g/l; KH_2PO_4 , 1 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; KCl , 0.5 g/l y FeSO_4 , 0.01 g/l). Los medios con fibra se

colaron para hacer que el líquido de cultivo fuera más translúcido. A la mitad de los matraces se les adicionaron 0.5 ml de Tween 80 (Sigma, St. Louis, Mo.) y, una vez inoculados, se colocaron en un baño metabólico cubierto, incubando a 26-28°C y agitando a 70 golpes/min durante 13 días.

La biomasa fúngica se determinó por peso seco del micelio al final del período de crecimiento, una vez separado aquél del medio y lavado con agua destilada. El micelio se filtró al vacío y se secó a 60°C hasta alcanzar peso constante. La esporulación se determinó por el número de conidios por ml, cuantificados en cámara de Neubauer. Se consideraron 4 matraces por variable, se calcularon las medias aritméticas y las desviaciones estándar, y se efectuó un análisis de varianza por comparación de medias múltiples con ajuste de probabilidades de Bonferroni (Wilkinson, 1987). Para determinar la conservación de la viabilidad, fragmentos miceliales de *H. thompsonii*, de un cultivo desarrollado en medio H, se resuspendieron en leche descremada al 0.07% y se transfirieron a recipientes estériles conteniendo gel de sílice, paja, salvado de trigo, agua destilada, solución salina 0.85%, y aceite mineral o glicerol al 10%. Para determinar la viabilidad, después de tres meses de conservación a temperaturas ambiente y de refrigeración, se sembró el hongo en medio H a partir de los diferentes soportes y se incubó a 26-28°C durante 10 a 12 días.

En los medios SAL y HM, ambos con Tween 80, se obtuvo la mayor biomasa. En general la esporulación fue baja en todos los medios; la mayor concentración de conidios se alcanzó en el medio de SAL sin Tween 80 y en HM con o sin Tween 80. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los distintos tratamientos se indican en la tabla 1.

En el medio de SAL adicionado de Tween 80 no se obtuvieron conidios, aunque la biomasa producida duplicó a la obtenida en el mismo medio sin Tween 80. El medio de IM resultó inadecuado tanto para la obtención de biomasa como para la esporulación.

Después de tres meses de almacenamiento, *H. thompsonii* se conservó viable. Se observó una velocidad de crecimiento mayor en las colonias que se almacenaron en temperaturas de refrigeración. Las características de macro y micromorfología de las colonias no se alteraron. La esporulación obtenida fue baja, y a diferencia de Van Winkelhoff y McCoy (1984), quienes describieron que el Tween 80 era esencial para obtener la máxima conidiación, nosotros encontramos que éste influyó positivamente en todos los casos, solamente en la producción de biomasa.

A partir del análisis de nuestros resultados, estimamos que el efecto del Tween 80 sobre la esporulación probablemente podría variar según la composición del medio de cultivo. En el medio de HM la concentración de conidios permaneció igual a pesar de que la biomasa micelial fue cuadruplicada en presencia del éster, y en el

Tabla 1. Esporulaci3n y crecimiento de *Hirsutella thompsonii* Fisher 59 en diferentes medios naturales

MEDIOS DE CULTIVO	ESPORULACI3N (conidios/ml) (10^3)	BIOMASA (peso seco en g)
	X \pm DS	X \pm DS
SALVADO	55.0 \pm 9.1(a)*	0.240 \pm 0.045(b)
SALVADO	0 (d)	0.505 \pm 0.045(a)
+ TWEEN 80		
HARINA DE MAÍZ	20.0 \pm 2.9(b)	0.105 \pm 0.013(c)
HARINA DE MAÍZ	20.0 \pm 3.2(b)	0.455 \pm 0.042(a)
+ TWEEN 80		
PAPA-ZANAHORIA	3.7 \pm 1.0(c)	0.270 \pm 0.015(b)
PAPA-ZANAHORIA	7.5 \pm 0.9(c)	0.295 \pm 0.045(b)
+ TWEEN 80		
INF. DE MAÍZ	1.2 \pm 0.6(c)	0.045 \pm 0.06(c)
INF. DE MAÍZ	0 (d)	0.065 \pm 0.021(c)
+ TWEEN 80		

*Las letras distintas indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los medios respectivos.

medio de SAL con Tween 80 no se produjeron conidios, a pesar de haberse duplicado la biomasa obtenida. Sólo se registró un efecto estimulante en el medio PZ con Tween 80.

Para la conservación de la viabilidad del hongo se recomienda el gel de sílice y la temperatura de refrigeración.

Por último, aunque la perspectiva de usar *H. thompsonii* como plaguicida biológico ya ha sido discutida y demostrada ampliamente (McCoy y Couch, 1982), existen aún varios problemas por resolver, como es la dificultad de obtener un gran número de conidios en cultivos sumergidos desarrollados en medios costeables y accesibles para la producción industrial a gran escala.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Derik Castillo y al Biol. Jesús Sánchez Robles su colaboración para la realización de los análisis estadísticos.

LITERATURA CITADA

- Cabrera, R.I., 1977. Estudio en Cuba de *Hirsutella thompsonii* Fisher. Control biológico del ácaro del moho (*Phyllocoptruta oleivora* Ashm.). *Agrotecnia de Cuba* 9: 3-11.
- Hall, R.A., N.W. Husfey y D. Mariau, 1980. Results of a survey of biological control agents of the coconut mite *Eriophyes querreronis* (Keifir). *Oleagineaux* 35:395-400.
- McCoy, C.W. 1981. Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*. En: Burges, H.D. (Ed.) *Microbial Control of Pests and Plants Diseases 1970-1980*. Academic Press, Londres, pp. 499-512.
- McCoy, C.W. y T.L. Couch, 1982. Microbial control of the citrus rust mite (*Phyllocoptruta oleivora*) with the mycoacaricide *Mycar*. *Fla. Entomol.* 65: 116-126.
- Sampedro, L. y J.L. Rosas, 1989. Selección de cepas de *Hirsutella thompsonii* Fisher para combatir al ácaro del cocotero *Eriophyes querreronis* Keifir. I. Bioensayos de Patogenicidad. *Rev. Mex. Mic.* 5: 225-231.
- Van Winkelhoff, A.J. y C.W. Mc Coy, 1984. Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos* in submerged culture. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 59-68.
- Wilkinson, L., 1987. *SYSTAT: The System for Statistics*. SYSTAT Inc., Illinois.