

## ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE PROPÁGULOS DE *VERTICILLIUM LECANII* (ZIMMERMANN) VIÈGAS

FACUNDO RIVERA<sup>1</sup>  
MARÍA VALDÉS<sup>2</sup>  
TERESA MIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. El Hombre y su Ambiente, CBS, UAM-Xochimilco. Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 México, D.F.

<sup>2</sup>Depto. de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Apartado Postal 63-246, 02800 México, D.F.

### ABSTRACT

PRELIMINARY STUDY ON YIELD AND STORAGE OF FUNGAL PROPAGULES FROM *VERTICILLIUM LECANII* (ZIMMERMANN) VIÈGAS. REV. MEX. MIC. 14: 33-36 (1998). *Verticillium lecanii* was grown in solid state culture with hydrated rice grains as well as liquid culture with both, yeast extract and glucose. The aim of the study was to observe the type of propagules formed and their viability conservation after three, nine months and three years of conservation in distilled water, silicagel and vermiculite at 4°C. The propagules formed were conidia ( $6.8 \times 10^6$ /ml) in the rice medium and blastospores ( $3.3 \times 10^7$ /ml) in the liquid medium, after 8-10 days of incubation at 25-27°C. Viability of fungus was maintained in all tested carriers during 3 and 9 months, and those preserved in silicagel lost their viability after three years.

**Key words:** entomopathogenic fungus, preservation, propagules, *Verticillium lecanii*.

### RESUMEN

*Verticillium lecanii* se cultivó en un medio sólido con granos de arroz hidratados y en un medio líquido con extracto de levadura y glucosa para determinar el tipo de propágulos fúngicos obtenidos y observar la conservación de su viabilidad a 4°C en agua destilada, cristales gel de sílice y vermiculita después de períodos de tres, nueve meses y tres años. Los propágulos observados, a los 8-10 días de incubación a 25-27°C, fueron conidios en el medio de arroz ( $6.8 \times 10^6$ /ml) y blastosporas ( $3.3 \times 10^7$ /ml) en el medio líquido. La viabilidad de los propágulos se mantuvo en todos los soportes ensayados durante tres y nueve meses, los preservados en gel de sílice perdieron la viabilidad a los 3 años.

**Palabras clave:** hongo entomopatógeno, preservación, propágulos, *Verticillium lecanii*.

## Introducción

El hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viègas, ha sido descrito ampliamente como un agente para el control de diversas plagas como mosquitas blancas (Ekbom, 1979), áfidos (Hall, 1976, 1981), cóccidos (Easwaramoorthy & Jayaraj, 1978), royas (Carrión, 1988; Whipps, 1993) y trips (Helyer *et al.*, 1992) entre otras. El hongo puede producir conidios si el medio de cultivo es sólido y blastosporas, si es líquido (Grajek, 1994). Dentro de este marco, en el presente trabajo fueron ensayados dos medios de cultivo de bajo costo, uno sólido y otro líquido, con el objetivo de determinar el tipo de propágulos fúngicos producidos en cada uno así como la

conservación de su viabilidad en diferentes soportes a 4°C.

## Materiales y métodos

Se utilizó la cepa C de *V. lecanii*, aislada a partir de la mosquita blanca, *Trialeurodes vaporariorum* West. colectada en un cultivo de frijol del estado de Morelos, México (Mier *et al.*, 1991) que había sido mantenida en medio H (agar 15 g/l, dextrosa 5 g/l, sacarosa 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, peptona 0.5 g/l) a 4°C. Para preparar el inóculo del presente ensayo, el hongo fue cultivado en el mismo medio

durante 10 días a 25-27°C, rango en el cual fluctúa la temperatura durante la época del año en la zona donde fue aislada la cepa del hongo. Enseguida, los conidios fueron resuspendidos en agua destilada estéril; se contaron en hematocitómetro y se ajustaron a una concentración de  $10^7$  conidios/ml.

El medio sólido fue elaborado con arroz comercial (Morelos, México). Para ello se depositaron 300 g de granos del cereal, previamente remojados durante 2 h, en cada una de tres botellas Roux. Se le adicionaron 30 ml de agua destilada por unidad y se esterilizaron a 121°C, 40 min. Cada una de las botellas fue inoculada con 2.5 ml de la suspensión de conidios de *V. lecanii* descrita previamente. El medio líquido fue elaborado con 3 g/l de extracto de levadura (SAF, México) y 5 g/l de glucosa (La Gloria, Tlalnepantla, México), ambos de calidad industrial. Se transfirieron 300 ml de medio a cada uno de tres matraces de Erlenmeyer y se esterilizó a 121°C, 15 min. Los matraces fueron inoculados de igual manera con 2.5 ml de la suspensión de conidios y se sometieron a un sistema de burbujeo de aire estéril constante durante 10 días con una bomba de aire (Máxima Air Pump, México). La temperatura de incubación en ambos casos fue de 25-27°C.

Los propágulos fúngicos obtenidos fueron conidios o blastosporas, éstos a su vez fueron cuantificados en un hematocitómetro. En el caso del medio sólido, se adicionaron 300 ml de agua destilada estéril para liberar los conidios. Se observó la capacidad germinativa de los propágulos producidos en ambos medios según el método de Robinson (1978) modificado, para lo cual se colocaron fragmentos de papel celofán de 2 cm<sup>2</sup> en placas de Petri con agar lavado a una concentración de 15g/l, posteriormente, sobre cada uno, se depositó una gota de una suspensión de conidios o blastosporas conteniendo  $10^7$  propágulos/ml. Se incubaron a 25-27°C, se registró el porcentaje de germinación en un total de 100 conidios o blastosporas a las 21 h observando al microscopio compuesto con un aumento de 400X y tomando en consideración aquellas células que exhibieron tubo germinativo. Para detener la germinación en el momento de la observación se adicionó una gota de glutaraldehído al 2%.

La preservación a 4°C de los propágulos obtenidos en los dos medios de cultivo se ensayó en tres sustratos diferentes: agua destilada (AD), cristales de gel de sílice (GS) y vermiculita (VC). Los conidios o blastosporas obtenidos a partir de cultivos incubados

durante 8-10 días a 25-27°C, bajo las condiciones previamente descritas, se suspendieron inmediatamente en agua destilada hasta obtener una suspensión celular de  $10^7$  propágulos/ml y se sembraron en medio H antes de iniciar el período de conservación, para constatar su viabilidad. En el caso de AD, se depositaron 3 ml de agua destilada en frascos viales de cristal de 5 ml de capacidad con tapón de rosca de malaquita, se esterilizaron a 15 lbs de presión durante 15 min y después se adicionaron 0.6 ml de la suspensión celular por vial. Para GS fueron depositados 2 g de cristales de gel de sílice (Silicagel 60 para cromatografía en columna, Merck) en los frascos viales y se esterilizaron al horno a 180°C durante 2 h. Aparte, se prepararon tubos con 7 ml de leche descremada (Sveltes, Nestlé) al 7%, se esterilizaron a 11 lbs de presión durante 13 min y después a cada tubo se le agregaron 2 ml de la suspensión celular, se agitó, se transfirieron alícuotas de 0.6 ml a cada uno de los viales conteniendo el gel de sílice esterilizado, se mezcló perfectamente con una varilla de vidrio en un baño de hielo, se mantuvieron en un desecador de vacío durante una semana y antes de pasarlos al refrigerador a 4°C se verificó la viabilidad del hongo sembrando en cajas de Petri conteniendo medio H. En VC se depositaron 0.4 g de vermiculita pH 7.0 (Aislantes y Acústicos, S.A., México) por vial, se esterilizó a 15 lbs de presión por 15 min y posteriormente se añadieron 0.6 ml de la suspensión celular por vial. A los tres, nueve meses y tres años de conservación fueron realizadas pruebas de viabilidad del contenido de cada uno de los viales para lo cual se sembró en cajas de Petri con medio H y se observó el desarrollo de las colonias, obtenido en cada caso. También se revisó la permanencia de las características de macro y micromorfología de *V. lecanii* en las colonias que se desarrollaron a partir de los propágulos conservados. Todos los experimentos descritos se llevaron a cabo por triplicado.

## Resultados

Los resultados confirmaron la producción de conidios en el medio sólido y blastosporas en el medio líquido. Los conidios formados en el medio de arroz, exhibieron una forma cilíndrica, así como una pared celular gruesa. En tanto, las blastosporas que se derivaron del medio líquido fueron esféricas, notoriamente más pequeñas que los conidios y presentaron una pared celular más delgada que la de aquellos. Las cifras

promedio obtenidas fueron del orden de  $6.8 \times 10^6$  conidios/ml en el medio sólido y de  $3.3 \times 10^7$  blastosporas/ml, en el medio líquido lo cual equivale a una cantidad de  $6.8 \times 10^6$  conidios y  $4.1 \times 10^9$  blastosporas por gramo de sustrato utilizado, respectivamente. Al margen del objetivo principal de este estudio consideramos de interés destacar que el rendimiento o producción de conidios por gramo de sustrato fue demasiado bajo. Si se considera que la dosis promedio recomendada para 1 ha en campo corresponde aproximadamente a  $10^{12}$  conidios (Sopp *et al.*, 1989), en este caso se requerirían alrededor de 150 Kg de arroz para cubrir las necesidades de producción de conidios por 1 ha, lo cual no sería factible ni rentable económicamente, contrastando con los requerimientos de 240 g de sustrato para la producción de blastosporas para 1 ha. Aunque la proporción de blastosporas producidas fue considerablemente mayor, sin embargo Hall (1981), ha mencionado que éstas pierden su viabilidad más rápidamente que los conidios. Lo anterior concuerda con los resultados de germinación obtenidos donde, bajo las condiciones estudiadas, la capacidad germinativa de las blastosporas (8%) fue aproximadamente 10 veces menor que la de los conidios (78.3%). Por otro lado, el hecho de que la pared de las blastosporas sea más delgada que la de los conidios, también puede repercutir en su viabilidad y permanencia en campo. Dicha propiedad representaría una desventaja competitiva que podría incidir en la sensibilidad de las blastosporas al efecto de las radiaciones solares, factor que ha sido descrito como uno de los responsables de la disminución de la supervivencia de los hongos en el follaje (Knudsen *et al.*, 1991).

El bajo porcentaje de germinación registrado, especialmente para blastosporas (Fig. 1b), posiblemente se deba a que las células ya habían rebasado la fase de crecimiento exponencial en el momento en que se realizó la prueba de germinación, o al efecto de la temperatura a la que se llevó a cabo el ensayo. Al respecto, se ha mencionado que tanto el crecimiento como la germinación de *V. lecanii* se ven disminuidos a temperaturas por encima de 25°C, llegando a cesar a los 30°C (Hall, 1981). Además, para los conidios (Fig. 1a), los resultados de germinación coinciden con los reportados por ese autor para este hongo, donde a las 21 h a 27°C los conidios alcanzaron un porcentaje de germinación de 80% y al extender el período de incubación a 25 h, casi el 90% de las células habían germinado. Es prudente mencionar que

aunque las blastosporas mostraron una capacidad germinativa tan baja, suponemos que aquellas células que aún no habían emitido el tubo germinativo debieron haber estado potencialmente viables, como lo sugieren los resultados del ensayo de viabilidad de los propágulos, donde se demostró que éstos habían permanecido viables durante tres y nueve meses en todos los soportes estudiados. Cumplidos los tres años de conservación, los propágulos que permanecieron viables fueron solamente aquellos mantenidos en AD y VC. Asimismo, las características de macro y micromorfología de *V. lecanii* no se alteraron durante el período de conservación en que los conidios y blastosporas mantuvieron su viabilidad.

Con base en estos resultados preliminares se recomienda probar medios y/o condiciones culturales diferentes, para incrementar la obtención de conidios, además de aumentar la proporción utilizada en el inóculo. Para el ensayo de germinación de ambos propágulos, prolongar el tiempo de incubación y

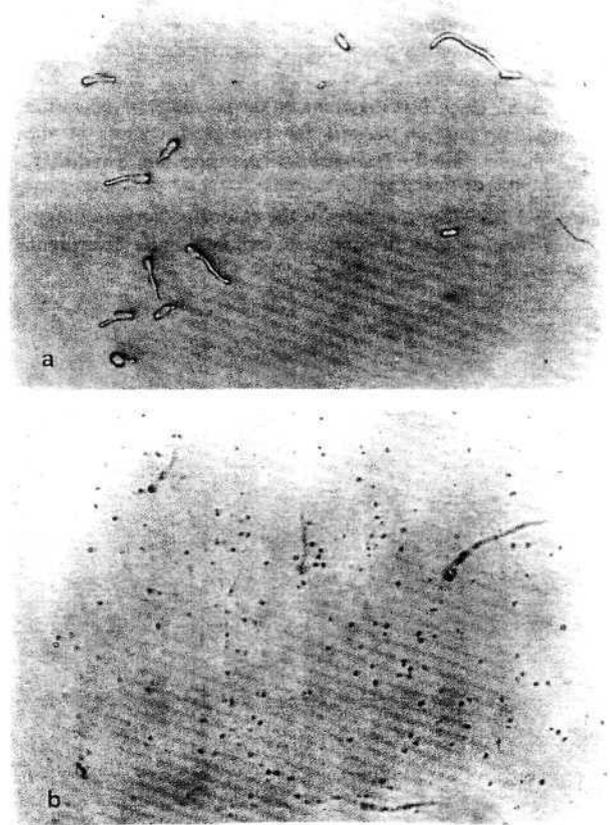


Fig. 1 Germinación de conidios (a) y blastosporas (b) de *Verticillium lecanii* obtenidos a partir de los medios sólido y líquido e incubados en agar-agua al 1.5% durante 21 horas.

reconsiderar factores externos como la temperatura y además, determinar la capacidad germinativa de las blastosporas durante el transcurso de su fase de crecimiento logarítmico. Asimismo, preservar los propágulos en soportes como AD y VC, para períodos de conservación mayores de nueve meses.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Miguel Ulloa, del Instituto de Biología de la UNAM, su gentil colaboración al tomar las microfotografías de *V. lecanii*. Facundo Rivera agradece al CONACyT el financiamiento otorgado durante sus estudios de posgrado.

### Literatura citada

- Carión, G., 1988. Estudios sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en México. **Mic. Neotrop. Aplic. 1**: 79-86.
- Easwaramoorthy, S. & S. Jayaraj, 1978. Effectiveness of the white halo fungus *Cephalosporium lecanii*, against field populations of coffee green bug, *Coccus viridis*. **J. Invertebr. Pathol. 32**: 88-96.
- Ekbom, B. S., 1979. Investigations on the potencial of a parasitic fungus *Verticillium lecanii* for biological control of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. **Swedish J. Agric. Res. 9**: 409-442.
- Grajek, W., 1994. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid state cultures. **Folia Microbiol. 39**: 29-32.
- Hall, R. A., 1976. A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidiospores on the aphid *Macrosiphonella sanborii*. **J. Invert. Pathol. 27**: 41-48.
- Hall, R. A., 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as microbial insecticide against aphids and scales. In: H.D. Burges (ed.), **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980**. Academic Press, London. pp. 483-497.
- Helyer, N., G. Gill, A. Bywater & R. Chambers, 1992. Elevated humidities for control of chrysanthemum pests with *Verticillium lecanii*. **Pestic. Sci. 36**: 373-378.
- Knudsen, G. R., D. J. Eschen, L. M. Dandurand & Z. G. Wang, 1991. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. **Appl. Environ. Microbiol. 57**: 2864-2867.
- Mier, T., F. Rivera, J. C. Bermúdez, Y. Domínguez, C. Benavides & M. Ulloa, 1991. Primer reporte en México del aislamiento de *Verticillium lecanii* a partir de la mosquita blanca y pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre este insecto. **Rev. Mex. Mic. 7**: 149-156.
- Robinson, P. M., 1978. **Practical Fungal Physiology**. John Wiley and Sons, London.
- Sopp, P. I., A. T. Gillespie & A. Palmer, 1989. Application of *Verticillium lecanii* for the control of *Aphis gossypii* by a low-volume electrostatic rotary atomiser and a high-volume hydraulic sprayer. **Entomophaga 34**: 417-428.
- Whipps, J. M., 1993. A review of white rust (*Puccinia horiana* Henn.) disease on chrysanthemum and the potential for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viègas. **Ann. Appl. Biology 122**: 173-174.

Recibido: 30 de septiembre, 1997. Aceptado: 9 de septiembre, 1998.  
Solicitud de sobretiros: Teresa Mier.