

Capítulo III. Medios líquidos para producción de blastosporas de *Simplicillium* sp. (Zimm.)

Resumen

Se evaluaron cuatro medios de cultivo líquidos para la producción de blastosporas de *Simplicillium* sp. Para dos de estos medios (BS y BQ) se utilizaron ingredientes disponibles en supermercados o tiendas locales, como fuentes de carbono y nitrógeno. Estos tratamientos fueron comparados con un medio a base de neopeptona, dextrosa y extracto de levadura (medio MB) y con el medio Jackson (2003) como cuarto tratamiento. La producción de blastosporas de *Simplicillium* fue afectada por los diferentes medios evaluados a través del tiempo ($p < 0.0001$). En general, los medios BQ y BS registraron una mayor producción de blastosporas. La curva de producción en estos dos medios tuvo un comportamiento muy similar. El valor máximo de producción de blastosporas para BS y BQ fue el día 14 después de la inoculación; la producción máxima de BQ fue superior alcanzando 1.2×10^8 blastosporas/mL, mientras que el de BS fue de 4.8×10^7 . El pico de producción de estos medios se alcanzó 6 días después que el del medio Jackson y 9 días después que el del medio MB; en el periodo que estos dos últimos medios alcanzaron la máxima producción, los medios propuestos rindieron 100 veces más que el medio MB y 10 veces más que el medio Jackson. La diferencia más notable se observó entre el medio BQ y el medio MB, donde el primero produjo 1000 veces más que el segundo.

Palabras clave: micoparásitos, blastosporas, fermentación líquida, *Simplicillium*

1. Introducción

La factibilidad de utilizar hongos entomopatógenos (HE) para el control de organismos dañinos depende de muchos factores; uno de ellos es la producción de propágulos en altas concentraciones de manera económica (Jaronski *et al.* 2007; Latifian *et al.* 2013). La formulación de medios de cultivo para la producción masiva de hongos entomopatógenos debe contener el balance de nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de estos (Jackson *et al.* 1997). Actualmente, la producción de HE se realiza de manera artesanal, utilizando arroz como sustrato el cual es inoculado con una suspensión de conidios de la cepa del hongo a producir. Este método por lo general lo utiliza el productor en su finca y pequeños comercializadores de insumos biológicos para el manejo de problemas fitosanitarios en los cultivos. También hay producción de manera semiindustrial e industrial con métodos más sofisticados utilizados por compañías desarrolladoras de bioplaguicidas. Cualquiera que sea el método utilizado puede obtener un producto final de buena calidad; la diferencia principal entre sistemas de producción radica en los volúmenes de producción (Monzón 2001). Los sistemas de producción de HE son por medio de fermentación líquida para la obtención de blastosporas o por fermentación sólida para la producción de conidios; sin embargo, las técnicas de producción masiva más viables incluyen la producción bifásica, donde inicialmente la propagación es en medio líquido y después el inóculo obtenido se siembra sobre sustratos sólidos para la obtención de conidios (Sahayaraj y Raja 2008).

L. lecanii y *B. bassiana* son organismos facultativos, lo cual permite producirlos masivamente en diferentes sustratos (Prasad y Pal 2014). *L. lecanii* puede ser fácilmente reproducido en la mayoría de medios sólidos agarizados que contienen papa-dextrosa, extracto de malta más peptona micológica, harina de avena, quitina o leche descremada. De esta forma se pueden obtener rendimientos de 1.4×10^7 conidios/cm² ($0.5-2 \times 10^9$ conidios/caja Petri). Dentro de los sustratos sólidos mayormente usados para la producción de estos y otros HE se encuentra el arroz (Elosegui 2006; Córtez 2007), aunque se pueden utilizar otros granos como avena, maíz y sorgo. Al respecto, Sahayaraj y Raja (2008) evaluaron seis cereales como medios sólidos y cuatro medios líquidos en la producción de *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *V. lecanii*. El cereal que produjo la mayor cantidad de conidios de *B. bassiana* fue el trigo mientras que para *P. fumosoroseus* y *V. lecanii* los mejores resultados se obtuvieron con granos de sorgo. En cuanto a los medios líquidos, el agua de coco fue el que presentó una mayor producción de blastosporas para los tres entomopatógenos. Por otra parte, Reyes *et al.* (2014) evaluaron 13 medios de cultivo líquidos en la producción de conidios en dos cepas de *L. lecanii*, el mejor resultado se obtuvo con el medio SDA suplementado con polvo de camarón, con un rendimiento superior a 5×10^9 conidios/mL.

Considerando la ausencia de información en la literatura sobre el comportamiento reproductivo del micoparásito del género *Simplicillium* encontrado creciendo sobre pústulas de *H. vastatrix* en Costa Rica, el objetivo de este trabajo fue evaluar su crecimiento en diferentes medios líquidos de cultivo y determinar su capacidad para producir blastosporas bajo estas condiciones de crecimiento, y generar curvas de concentración en el tiempo para determinar el momento en el que alcanza su pico de producción.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepa y obtención de inóculo inicial

La cepa de *Simplicillium* sp. utilizada en este experimento fue aislada de pústulas de roya del café (*Hemileia vastatrix*) en la zona cafetalera de Turrialba, Costa Rica y codificado con las siglas EC. Esta cepa mostró un alto grado de virulencia hacia *H. vastatrix* (Capítulo IV) en pruebas realizadas sobre discos de hoja. La cepa se conserva en el Laboratorio de Control Microbial del Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza (CATIE), utilizando el método de papel filtro (Morales 2008).

Para la prueba de crecimiento en medios líquidos, la cepa EC fue reaislada de la colección en papel filtro y sembrada en medio Papa Dextrosa Agar (PDA); posteriormente se obtuvieron colonias monospóricas de 10 días de edad de las cuales se generó el inóculo inicial para ser utilizado en los medios de cultivo evaluados.

2.2. Composición de medios y criterios de selección de nutrientes

Se utilizó un total de cuatro medios líquidos para esta prueba: medio Jackson (MJ), medio base (MB), medio bayfolan-Soya (BS) y medio Bayfolan-Quitina (BQ).

MJ: el medio de cultivo propuesto por Jackson *et al.* (1997) fue utilizado como control ya que en trabajos publicados por el autor, se indican altas concentraciones de blastosporas de *Pacecillomyces fumosoroseus*. Este medio fue utilizado con las modificaciones hechas por Reyes *et al.* (2014) para la producción de *L. lecanii*.

MB: este es un medio comúnmente usado para la producción bifásica de hongos filamentosos, como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el Laboratorio de Control Microbial del CATIE. Contiene neopeptona, dextrosa y extracto de levadura a razón de 20, 40 y 10 g/l respectivamente.

BS: el medio fue desarrollado por Hidalgo *et al.* (2005) en una investigación para desarrollar medios líquidos de bajo costo para la inducción de blastosporas en cultivos sumergidos de hongos filamentosos. La combinación de harina de soya (SOYASAN®), sacarosa y Bayfolan ® como fuente de nitrógeno dieron los mejores resultados en este estudio alcanzando concentraciones de 1.5×10^8 blastosporas/mL.

BQ: el cuarto tratamiento (BQ) fue una modificación del medio BS. La modificación consistió en la adición de 5 g/L de quitina coloidal. La relación carbono nitrógeno para los dos medios alternativos propuestos fue de 1:2. El criterio de selección de fuentes de carbono y nitrógeno fue hecho con base en estudios previos realizados por Hidalgo *et al.* (2005) sobre *Trichoderma*, *Cylindrocarpon* y *Clonostachys*. Con dichas fuentes se obtuvo la mejor producción de blastosporas de estos hongos.

La composición de los medios evaluados se observa en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Composición de los medios líquidos evaluados en la producción de blastosporas de *Simlicillium* sp.

Componentes g/L	Medio			
	Jackson	MB	BS	BQ
KH ₂ PO ₄	2.0			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05			
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.016			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.014			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.036			
CaCl ₂	0.4			
Dextrosa	80	40		

Caseína hidrolizada	13.2			
Vitaminas ¹	3.15			
Neopeptona		10		
Extracto de levadura		2.0		
Sacarosa			7.5	7.5
Bayfolán ^{MR}			54.6	54.6
Soya (SOYASAN ^{MR})			10	10
Quitina coloidal				5
Vitaminas	*			

*Palmitato de vitamina A 2,500 IU/mL, colecalciferol 667 IU/mL y ácido ascórbico 50 mg/mL

2.3. Preparación e inoculación de medios

Los medios fueron preparados en agua destilada estéril de acuerdo a las concentraciones descritas en la sección 2.2; posteriormente fueron autoclavados a 120°C durante 15 minutos. Una vez autoclavados se vertieron 50 mL en Erlenmeyer con capacidad de 125 mL. Posteriormente se hizo un raspado de micelio de *Simplicillium* de 10 días de crecimiento sobre PDA, se preparó una suspensión filtrada de esporas y se estimó la concentración de conidios en cámara Neubauer. Los frascos que contenían los diferentes medios fueron inoculados para una concentración inicial de 1×10^6 conidios/50 mL de medio. Una vez inoculados, los frascos fueron sellados con papel aluminio estéril y sobre este papel celofán.

2.4. Condiciones de cultivo y toma de datos

Los frascos que contenían los medios de cultivo fueron colocados sobre un agitador orbital (VWR Scientific Products – USA) a 150 rpm a una temperatura que fluctuó de 25 a 28°C. Cada 24 h después de la inoculación se tomaron muestras de cada uno de los medios utilizando una pipeta Pasteur previamente esterilizada para cargar la cámara Neubauer y determinar la concentración de blastosporas.

2.5. Diseño y análisis estadístico

El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar con cinco repeticiones; cada repetición consistió de un Erlenmeyer los cuales fueron puestos aleatoriamente en el agitador orbital. El análisis fue hecho mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2016). La variable respuesta (no. de blastosporas) se transformó al logaritmo natural. Finalmente se hicieron análisis de conglomerados para ajustar el mejor modelo.

3. Resultados

La producción de blastosporas de *Simplicillium* fue afectada por los diferentes medios evaluados a través del tiempo ($p < 0.0001$). En general, los medios BQ y BS registraron una mayor producción de blastosporas. Los valores más bajos se observaron en el medio MB durante todas las mediciones, aunque este fue el único tratamiento que presentó producción de blastosporas 24 h después de la inoculación. La mayor cantidad de blastosporas en el medio MB se registró al día cinco, la cual fue una producción baja (7.8×10^5) en comparación con los otros medios estudiados.

El valor más alto en el MJ fue registrado durante los días ocho y nueve después de la inoculación. La producción en estos días fue de 5.5×10^6 y 5.8×10^6 , respectivamente, dichos valores no difirieron estadísticamente (DGC=0.05). Este medio fue superior al medio MB pero inferior a BS y BQ.

La curva de producción de blastosporas en los medios BS y BQ tuvo un comportamiento similar, durante los primeros cinco días de observaciones hubo diferencias únicamente a los tres y cuatro días después de la inoculación; posteriormente mantuvieron valores iguales hasta el día 13. El valor máximo de producción de blastosporas para ambos medios fue el día 14, donde BQ fue superior alcanzando 1.2×10^8 esporas/mL, mientras que el valor máximo para BS fue de 4.8×10^7 . Dichos valores fueron estadísticamente diferentes (DGC $p=0.05$). A partir de este punto, la producción de blastosporas no difirió dentro de cada uno de estos medios respecto al tiempo, aunque la diferencia permaneció entre medios durante las últimas observaciones (Figura 7).

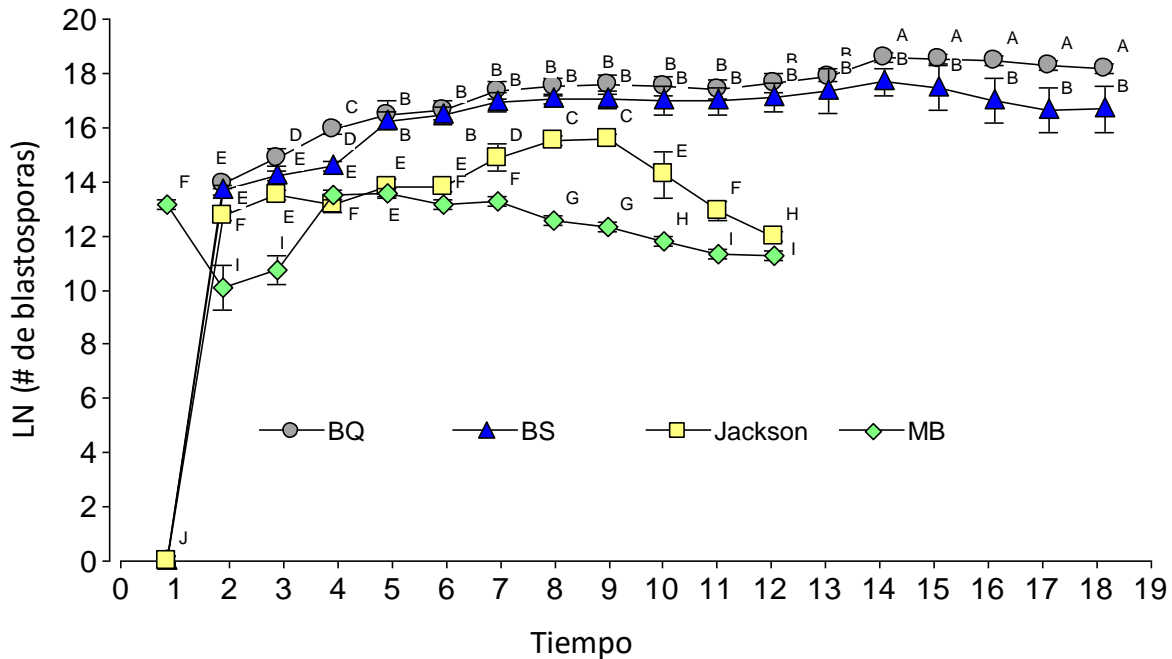


Figura 7. Producción de blastosporas (variable transformada a logaritmo natural) de *Simplicillium* en diferentes medios de cultivo. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (DGC=0.05).

(**BQ**: bayfolan quitina; **BS**: bayfolan soya; **Jackson**; Jackson **MB**: Medio base)

4. Discusión

Los medios alternativos propuestos (BS y BQ) fueron los que registraron mayor producción de blastosporas. Si bien el pico de producción en estos medios se alcanzó seis días después en MJ y nueve días en MB, en el periodo en el que MJ y MB alcanzaron la máxima producción, los medios BS y BQ rindieron 100 veces más que el medio MB y 10 veces más que el MJ.

La diferencia más notable se dio entre los medios BQ y MB, donde el primero produjo 1000 veces más que el segundo. El medio MB indujo un rápido inicio en la producción de blastosporas, 24 horas después de la inoculación, pero después disminuyó significativamente su concentración para iniciar un nuevo ciclo de producción. Este comportamiento irregular de este medio durante las primeras tres fechas de observación puede ser debido al tiempo que las blastosporas tardaron en separarse de los cuerpos hifales formados al segundo día de producción y a su rápida germinación en este medio. La curva de producción de los tres tratamientos restantes inició el crecimiento exponencial a partir de las 48 horas después de la inoculación. La caída de producción de blastosporas fue en menor tiempo para MB (6 días después de la inoculación) y para MJ (10 días después de la inoculación), teniendo estos una fase estacionaria corta. Dicha fase fue más prolongada en los medios BS y BQ, de manera que 19 días después de la inoculación la producción

de blastosporas siguió mostrando valores estadísticamente iguales al mayor pico de producción para ambos medios (Figura 7).

La adición de quitina coloidal al medio BQ mejoró la producción de blastosporas. Al respecto, Reyes *et al.* (2014) evaluaron 13 medios de cultivos y aquel al que se añadió residuos de camarón (usado comúnmente para extracción de quitina) favoreció la esporulación de *L. lecanii*, taxón relacionado con el género *Simplicillium* (Zare y Gams 2001). Lo anterior indica que la quitina, al ser un compuesto que está presente en la pared celular de hongos y exoesqueletos de insectos (Barboza *et al.* 2008), puede servir como un estimulante en la producción de HE como *L. lecanii* o micoparásitos como *Simplicillium*. Hegedus *et al.* (1990) mencionan que debido a la lisis de la quitina se forma el monómero N-acetil-glucosamina, el cual es usado como fuente de nitrógeno y carbono. Adicionalmente, los medios propuestos contienen minerales que pudieron haber favorecido su desempeño respecto a los otros.

Es importante mencionar que se carece de reportes previos referentes a la fermentación de *Simplicillium* en medios líquidos, por lo que estos primeros resultados contribuyen con conocimiento base para futuros trabajos de investigación enfocados a la producción masiva y uso de este hongo como una opción para el manejo de la roya del café.

5. Literatura citada

- Barboza, C. J. E; Reyes R D. M; Salcedo H. R; Bautista M; Jiménez B. Bideshi K. D. 2008. Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-73. *Mol. Biotechnol.* 39(1):29–37.
- Córtez, M. H. 2007. Producción de *Lecanicillium (=Verticillium) lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. *Agricultura Técnica en México* 33(1):83–87.
- Di Rienzo J.A; Casanoves, F; Balzarini M.G; González L; Tablada M; Robledo, C.W. InfoStat versión 2016. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en URL <http://www.infostat.com.ar>
- Elósegui, O. C. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. La Habana, Cuba, INISAV. 61 p.
- Hegedus, D. D; Bidochka M. J; Kachaturians G. G 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing Chitin, Two hexosamines or glucose. *App. Microbiol. Biotechnol.* 33(6):641-647.
- Hidalgo, J. E; García J; Martínez A; Stirrup T; Krauss U; Steuten C. 2005. Inexpensive media for liquid fermentation of antagonist fungi *Trichoderma ovalisporum*, *Clonostachys* spp. and *Cylindrocarpon victoriae*. Informe de investigación. CABI.

- Jackson, M. A.; McGuire, M. R., Lacey, L. A; Wraight S. P. 1997. Liquid Culture Production of Desiccation Tolerant Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res. 101(1):35–41.
- Jackson, M. A; Cliquet S; Iten. B. L. 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Biocontrol Sci. Technol. 13(1):23–33.
- Jaronski, S. T; Schaeffer C. F; Jung K; Boetel M; Majumdar A. 2007. Challenges in using *Metarhizium anisopliae* for biocontrol of sugarbeet root maggot, *Tetanops myopaeformis*. Bulletin IOBC/wprs 30(7):119–124.
- Latifian, M; Rad B; Amani M; Rahkhodaei E. 2013. Mass production of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) by using agricultural products based on liquid – solid diphasic method for date palm pest control. Intl. J. Agric. Crop Sci. 5(19):2337–2341.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas no. 63:95–103.
- Morales, A. 2008. A simple way to preserve fungal cultures (sitio web). Cornell University. Disponible en <https://blog.mycology.cornell.edu/2008/01/10/a-simple-way-to-preserve-fungal-cultures/>
- Prasad, C. S; Pal R. 2014. Mass production and economics of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecanii* on agricultural and industrial waste. Sch. J. Agric. Vet. Sci. 1(1):28–32.
- Reyes, H. J. E; Alatorre R. R; Shirai M. K; Vaquera H. H; Virgen C. G; Medina U. V; Loera C. O. 2014. Components of liquid media on the production of high spore concentrations of *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Gams and Zare. J. of Agr. Sci. and Technol. 4:767–779.
- Sahayaraj, K; Raja N. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African Journal of Biotechnology 7(12):1907–1910.
- Zare, R; Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedwigia 73:1-50.