



ORIGINAL

## Producción de unidades infectivas de *Isaria fumosorosea* (*Hypocreales: Cordycipitaceae*) a partir de aislados nativos del noreste de México mediante 3 estrategias de propagación



Fatima L. Gandarilla-Pacheco<sup>a,b</sup>, Lilia H. Morales-Ramos<sup>a</sup>,  
Benito Pereyra-Alfárez<sup>a</sup>, Myriam Elías-Santos<sup>a</sup> e Isela Quintero-Zapata<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Biomedicina Molecular, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México

Recibido el 31 de octubre de 2016; aceptado el 20 de marzo de 2017

Disponible en Internet el 28 de septiembre de 2017

### PALABRAS CLAVE

Blastosporas;  
Cultivo sumergido;  
Conidios;  
Fermentación sólida;  
Cultivo bifásico

**Resumen** El objetivo del presente estudio fue evaluar la producción de blastosporas y conidios de diferentes aislados nativos de México del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* y de una cepa de colección mediante diferentes técnicas de propagación. En la producción de blastosporas se utilizaron 2 medios de cultivo líquidos (sumergidos), uno a base de casaminoácidos y el otro a base de peptona de colágeno como fuentes de nitrógeno, con glucosa como fuente de carbono en ambos. Para la producción de conidios, los hongos se cultivaron en agar papa dextrosa, a partir de esos cultivos se prepararon suspensiones de  $1 \times 10^6$  conidios/ml para inocular matraces con caldo dextrosa Sabouraud, para iniciar así la fase líquida del cultivo bifásico, denominado también precultivo. Posteriormente con el precultivo y las suspensiones de conidios se inocularon bolsas con granos de arroz, que se incubaron durante 14 días para el cultivo bifásico y para la fermentación sólida, respectivamente. El aislado HIB-23 fue el que logró la más elevada concentración de blastosporas obtenida en el cultivo sumergido:  $4,90 \times 10^8$  blastosporas/ml en el medio casaminoácidos; y en el medio con peptona de colágeno se obtuvieron  $2,15 \times 10^8$  blastosporas/ml. La máxima producción de conidios en fermentación sólida la logró la cepa Pfr-612 ( $1,58 \times 10^9$  conidios/g), mientras que la máxima en cultivo bifásico correspondió al aislado HIB-30 ( $9,00 \times 10^6$  conidios/g). La fermentación sólida resultó ser el método más efectivo, con un promedio de  $1,09 \times 10^9$  conidios/g, mientras que el cultivo bifásico fue el

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [isela.quinteroalp@uanl.edu.mx](mailto:isela.quinteroalp@uanl.edu.mx) (I. Quintero-Zapata).

## KEYWORDS

Blastospores;  
Submerged culture;  
Conidia;  
Solid-state  
fermentation;  
Biphasic culture

menos efectivo, con un promedio de  $2,76 \times 10^6$  conidios/g. Para la producción de blastosporas en los medios sumergidos no se obtuvo diferencia significativa alguna.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Production of infectious units of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) from different indigenous isolates of northeastern Mexico using 3 propagation strategies

**Abstract** The aim of this study was to evaluate the production of blastospores and conidia of different native isolates and a strain of *Isaria fumosorosea* using different propagation techniques. Two liquid culture media of casamino acids and peptone as nitrogen sources and glucose as carbon source for both media cultures were respectively used in the production of blastospores, while for the production of conidia, the fungi were grown in potato dextrose agar; from these cultures, solutions of conidia to a concentration of  $1 \times 10^6$  per milliliter were prepared to inoculate flasks with Sabouraud dextrose broth for the liquid phase of the biphasic culture, also known as preculture. Subsequently, rice grain bags were inoculated with the preculture and the conidia solutions, which were incubated for 14 days for solid fermentation and biphasic culture, respectively. The HIB-23 isolate recorded a concentration of  $4.90 \times 10^8$  blastospores/ml in the casamino acid medium, while a concentration of  $2.15 \times 10^8$  blastospores/ml was obtained in the peptone collagen medium. For the Pfr-612 strain, the conidia production in solid-state fermentation was  $1.58 \times 10^9$  conidia/g, and for HIB-30 in the biphasic culture of  $9.00 \times 10^6$  conidia/g. Solid-state fermentation proved to be the most effective method with an average of  $1.09 \times 10^9$  conidia/g, whereas the biphasic culture was the least effective method with  $2.76 \times 10^6$  conidia/g; no significant difference was reported for the submerged production media.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

En las últimas décadas, los hongos entomopatógenos se han convertido en una alternativa importante en la conformación de un espectro más amplio de insecticidas, dentro de los esquemas contemporáneos de manejo de insectos plagas<sup>21,26,33</sup>. Recientemente, el enfoque de la investigación sobre estos hongos se aceleró y ha generado 2 líneas principales: en primer término, el estudio de la biología molecular, la genómica y la proteómica de los entomopatógenos; en segundo lugar, el uso práctico de estos agentes en los planes de manejo de plagas de insectos.

Dentro de ese segundo enfoque, *Isaria fumosorosea* ocupa un lugar destacado como uno de los hongos entomopatógenos más conocidos a nivel mundial, con una amplia distribución geográfica (incluyendo zonas templadas y tropicales) y un extenso rango de hospederos, lo cual lo hace un agente de interés para el desarrollo de métodos de control biológico<sup>22,38</sup>.

*I. fumosorosea* produce principalmente dos tipos de propágulos: conidios y blastosporas<sup>17</sup>. Los conidios aéreos comprenden el principal ingrediente activo de los micoinsecticidas, por ser uno de los propágulos más viables empleados en programas de biocontrol<sup>7,19</sup>. Estos cuerpos especializados se caracterizan por poseer una gruesa pared exterior, constituida por 3 capas que protegen el interior de la espora.

Esta gruesa pared se diferencia de la pared celular de las células vegetativas del hongo, que son mucho más delgadas y no están formadas por capas constitutivas, como las esporas. La ventaja para la espora de poseer una pared celular gruesa es que esa pared la aísla del medioambiente y le permite sobrevivir en condiciones adversas, manteniéndola en latencia hasta que las condiciones sean propicias para la germinación<sup>1</sup>. Por su parte, a las blastosporas se las considera una forma levaduriforme; estas son más sensibles a la desecación y tienden a morir más rápidamente que los conidios<sup>17</sup>. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que las blastosporas son más efectivas que los conidios aéreos para el control de insectos como moscas blancas, áfidos y escarabajos, por mencionar solo algunos<sup>3,32,36</sup>.

La producción de estos propágulos depende de diversos factores, como los métodos y los medios de cultivo utilizados, así como del tipo de vegetal afectado y del insecto blanco. Respecto de las necesidades nutricionales de los hongos, estas comprenden principalmente fuentes de carbono y de nitrógeno, ya que los hongos requieren estos nutrientes durante la esporulación. La glucosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada por los hongos, la fructosa y la manosa se ubicarían a continuación; también pueden utilizar otros compuestos, entre ellos galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, además de polisacáridos como almidón, celulosa, pectina<sup>15</sup>, quitina<sup>16</sup>, sorbitol y

manitol<sup>4</sup>. Por otra parte, después del carbono y del oxígeno, el nitrógeno es el elemento más abundante en las células de los hongos, y es uno de los nutrientes más caros en el medio de fermentación<sup>37</sup>.

La identificación de fuentes de nitrógeno de bajo costo es fundamental en el desarrollo de un medio adecuado de producción para un biopesticida. El nitrógeno se puede encontrar en fuentes orgánicas complejas, como semillas de algodón y harinas de soya, que son generalmente más económicas que los compuestos de nitrógeno altamente refinados, como los hidrolizados ácidos y enzimáticos de caseína o de soya, o las proteínas de la carne<sup>27</sup>.

*I. fumosorosea* ha sido desarrollada en cultivo líquido o sumergido<sup>2,5,17,27</sup>, en cultivo bifásico<sup>28</sup> y en una amplia variedad de sustratos naturales<sup>5,10</sup>. Respecto de las técnicas de propagación, estas varían considerablemente. Una gran cantidad de ellas están basadas en fermentaciones sobre un sustrato sólido con granos de cereales; otras usan sustratos no nutritivos, como gránulos de arcilla. Otras tecnologías se desarrollan en tanques de fermentación para obtener productos a base de micelio, blastosporas o conidios sumergidos. En general, los tipos de cultivo más comúnmente utilizados en la producción de hongos se pueden clasificar en cultivos bifásicos y cultivos líquidos agitados o fermentaciones líquidas. En los sistemas bifásicos se desarrolla el inóculo en cultivo líquido agitado y luego se pasa al soporte sólido. En este tipo de cultivo es importante siempre optimizar la fase líquida, para que promueva un rápido crecimiento del aislado. Es el más utilizado en el mundo, ya que se obtienen estructuras infectivas de alta calidad y se acorta el tiempo cuando la fase líquida es en agitación<sup>19</sup>.

Se dispone de un amplio rango de sustratos sólidos para su uso en la producción de hongos entomopatógenos destinados al control biológico. La selección del sustrato depende de varios factores, incluyendo la disponibilidad, los costos y la adaptabilidad de cada aislado. Por su parte, los cultivos líquidos poseen un alto grado de automatización del proceso, son muy rápidos y tienden a formar abundantes blastosporas. Una de las ventajas de estos sistemas radica en el óptimo aprovechamiento de los nutrientes y en los bajos niveles de contaminación<sup>20</sup>.

En años recientes, en México y en general en el continente americano se ha hecho extensiva la presencia del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, un insecto vector de una de las enfermedades más devastadoras a escala mundial, el huanglongbing, causante de grandes pérdidas en la industria citrícola<sup>14</sup>. Debido a esto, los esfuerzos se han centrado primariamente en el control del vector con el uso de diferentes estrategias, una de ellas es el uso de hongos entomopatógenos, específicamente de *I. fumosorosea*, por la facilidad de producir sus estructuras infectivas en una amplia variedad de sustratos, como ya se describió anteriormente<sup>31</sup>.

Se sabe que existen diferentes requisitos para que un hongo sea considerado un agente de control biológico potencial de una o varias plagas; uno de esos requisitos es que pueda producir propágulos infectivos a altas tasas. Esto hace necesario evaluar el uso de diferentes estrategias de producción, así como de diversos medios de cultivo o sustratos para una propagación efectiva.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la factibilidad de producir conidios y blastosporas de 4 aislados nativos

del noreste de México y de una cepa de colección de *I. fumosorosea* que han mostrado hasta un 62% de mortalidad sobre adultos de *D. citri* en estudios previos<sup>12</sup>, mediante fermentación sólida y cultivo bifásico, utilizando grano de arroz como sustrato, y en cultivo sumergido, en 2 medios con diferente fuente de nitrógeno (casaminoácidos y peptona de colágeno).

## Materiales y métodos

**Microorganismos.** Los aislados de *I. fumosorosea* fueron obtenidos de suelos de la región citrícola de los municipios de Linares y Montemorelos, estado de Nuevo León, México, a 350 y 430 msnm, respectivamente (tabla 1). El método para el aislamiento de los diferentes hongos entomopatógenos fue descrito anteriormente<sup>11</sup>. Los cultivos madre (cultivos stock) se depositaron en la colección del laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas-Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL). Para su conservación se usaron viales criogénicos con 1 ml de glicerol al 10% v/v, almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los aislados nativos utilizados corresponden a las claves HIB-19, HIB-23, HIB-29 y HIB-30 y la cepa de colección corresponde a la clave Pfr-612 de *I. fumosorosea*.

**Producción de blastosporas en cultivo sumergido.** Medio M. Jackson<sup>18</sup>: los componentes del medio basal por litro fueron los siguientes:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 37 mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 16 mg; y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 14 mg. Al medio basal se le agregó glucosa (80 g/l) y casaminoácidos (25 g/l). La solución de glucosa fue esterilizada por separado antes de agregarse al medio basal. Medio C. Rivas<sup>9</sup>: los componentes del medio por litro fueron los siguientes:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,0 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,8 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,6 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g; glucosa, 80 g; peptona de colágeno, 15 g; y extracto de levadura, 5 g.

Todos los hongos fueron cultivados por espacio de 14 a 21 días en agar papa dextrosa a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Después se prepararon suspensiones de  $5 \times 10^5$  conidios/ml con agua destilada estéril para inocular el cultivo líquido (sumergido). Se usaron matraces con hendiduras internas (baffles) de 250 ml con 100 ml de medio, se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  y 300 rpm en un incubador con agitación orbital<sup>14</sup>. Al final del crecimiento se determinaron la concentración de blastosporas y la biomasa, y después del secado el porcentaje de viabilidad.

Durante el crecimiento de los hongos en medio líquido se contaron blastosporas/ml (a las 24, 48 y 72 h) y al final (72 h) se determinó el peso seco. La concentración de blastosporas se determinó usando una cámara de Neubauer, después de realizar diluciones ( $10^{-6}$  a  $10^{-8}$ ). Para medir la biomasa se determinó el peso seco, se tomó 1 ml de cultivo y se filtró al vacío a través de membranas de microfibras de vidrio, con filtros de 110 mm de diámetro, que se lavaron con 1 ml de agua destilada. Los filtros se secaron 24 h a  $100^{\circ}\text{C}$  y se pesaron. La concentración de blastosporas se expresó en blastosporas/ml y la biomasa con base en el peso seco, en g/l. Las blastosporas fueron recuperadas mediante secado por aire. Después de 72 h de incubación se cosecharon los cultivos de todos los experimentos o las suspensiones de esporas, las blastosporas fueron filtradas 2 veces a través de una doble gasa para eliminar el exceso de micelio. El cultivo se formuló con tierra de diatomeas al 5% (p/v), la suspensión se filtró

**Tabla 1** Hongos entomopatógenos aislados en suelos donde se cultivan cítricos en diferentes localidades del estado de Nuevo León, México

Clave	Localidad de colecta	Localización geográfica	Elevación (msnm)	Especie
HIB-19	Linares	N 25°09'13'' O 99°51'10''	350	<i>I. fumosorosea</i>
HIB-23	Montemorelos	N 25°10'03'' O 99°51'10''	430	<i>I. fumosorosea</i>
HIB-29	Montemorelos	N 25°18'12'' O 99°53'13''	430	<i>I. fumosorosea</i>
HIB-30	Montemorelos	N 25°10'03'' O 99°57'11''	430	<i>I. fumosorosea</i>

al vacío a través de un embudo Buchner usando papel de filtro Whatman n.º 1. Los filtrados obtenidos se secaron 24 h a temperatura ambiente (25-28 °C), se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a 4 °C.

La viabilidad de las formulaciones de blastosporas de *I. fumosorosea* se determinó tomando de cada bolsa 50 mg de blastosporas secas, a las que se adicionaron 50 ml de caldo papa dextrosa en un matraz Erlenmeyer con hendiduras internas (baffles) de 250 ml de capacidad. Después de 6 h de incubación a 28 °C y 300 rpm en un incubador con agitación orbital, se contaron 100 blastosporas microscópicamente para evaluar el tubo germinativo. El criterio para considerar a una espора viable fue cuando se formó un tubo germinativo tan largo como la mitad del diámetro de la espора<sup>12</sup>. La viabilidad se expresó en porcentaje de germinación.

**Producción de conidios en cultivo bifásico.** Todos los aislados de *I. fumosorosea* fueron cultivados en agar papa dextrosa entre 14 y 21 días a 25 ± 2 °C. Después se prepararon suspensiones de 1 × 10<sup>6</sup> conidios/ml con agua destilada estéril para inocular 10 ml en matraces Erlenmeyer con hendiduras internas (baffles) de 250 ml, en los que había 90 ml de caldo dextrosa Sabouraud. Estos matraces se incubaron durante 72 h a 28 °C y 300 rpm en un incubador con agitación orbital<sup>17</sup>.

**Producción de conidios en fermentación sólida.** Todos los aislados de *I. fumosorosea* se cultivaron en agar papa dextrosa entre 14 y 21 días a 25 ± 2 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, con una asa bacteriológica se desprendieron los conidios aéreos para preparar las suspensiones de conidios con Tween 80 al 0,01% (v/v), a una concentración de 1 × 10<sup>6</sup> conidios/ml, estas se utilizaron para inocular el sustrato.

**Preparación e inoculación del sustrato para la fermentación sólida y el cultivo bifásico.** Se utilizaron bolsas transparentes de polietileno de alta densidad de 1 kg de capacidad. En cada bolsa se colocaron 50 g de arroz (*Oryza sativa* L.) y 60% de agua bidestilada (p/v); las bolsas se esterilizaron a 121 °C, 103,40 kPa, durante 15 min. Las bolsas se inocularon con 5 ml de cada una de las suspensiones del pre-cultivo en el caso del cultivo bifásico, o con 5 ml de cada una de las suspensiones de conidios para la fermentación sólida, tratando de esparcirlas de manera uniforme sobre el sustrato; al terminar, las bolsas fueron selladas herméticamente. Luego se incubaron 14 días a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y se expusieron a la luz blanca de las lámparas del laboratorio (12:12 h luz:oscuridad). Las bolsas fueron agitadas cada 3 días para esparcir las esporas homogéneamente sobre el sustrato. Al final del tiempo de crecimiento se determinaron la concentración de conidios y su porcentaje de viabilidad<sup>32</sup>.

**Medición de la productividad del sustrato en fermentación sólida y en cultivo bifásico.** A los 14 días de incubación se determinó la concentración de conidios por gramo de arroz de cada bolsa. Se realizaron diluciones (10<sup>-6</sup> a 10<sup>-8</sup>) en una solución de Tween 80 al 0,01% (v/v) y se contaron los conidios usando una cámara de Neubauer. Para determinar la viabilidad se adicionó 1 g de arroz a 50 ml de caldo papa dextrosa. Este cultivo se mantuvo en agitación rotatoria (300 rpm) a 25 ± 2 °C durante 6 h, tras lo cual se tomaron muestras y se contaron 100 esporas (conidios germinados y no germinados), para cuantificar la proporción de estas que fueron viables, según el criterio de la longitud del tubo germinativo antes descrito. La viabilidad se expresó en porcentaje de germinación y este procedimiento se repitió periódicamente hasta completar 4 semanas<sup>13</sup>.

Los resultados se expresaron como valores promedio más/menos el error estándar. Para verificar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, luego de convertir los resultados a sus logaritmos (log<sub>10</sub>) para introducirlos en el programa estadístico y, en caso de cumplir con esta condición, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para las medias. Los datos fueron analizados con el programa IBM SPSS® v.19 Inc., Nueva York, EE. UU. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos en 2 ocasiones.

## Resultados y discusión

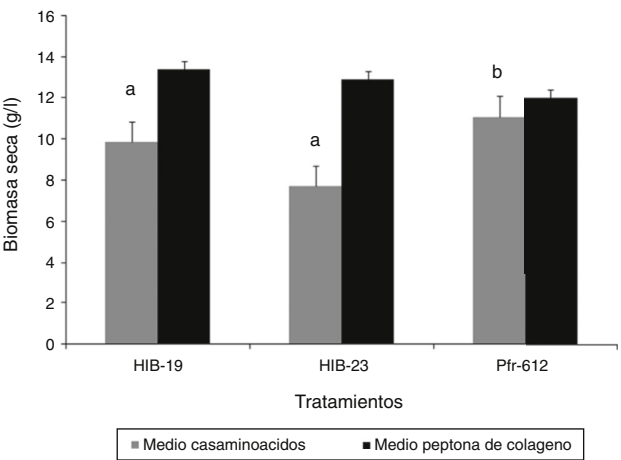
**Producción de blastosporas.** La producción de blastosporas en medio líquido aumentó exponencialmente, como se esperaba, a partir de las 48 h en el medio con casaminoácidos. Sin embargo, en el medio con peptona de colágeno no se registró crecimiento hasta las 72 h de incubación. A las 24 h no se detectó crecimiento, y no se obtuvo diferencia significativa en el número de blastosporas/ml entre los diferentes aislados cultivados en el medio con casaminoácidos a las 48 h ni en ninguno de los dos medios a las 72 h ( $p \geq 0,05$ ) (tabla 2).

La producción de biomasa en el medio con casaminoácidos a las 72 h mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los hongos evaluados. La cepa Pfr-612 mostró la mayor producción (13,50 g/l) y el aislado HIB-23 solamente 7,70 g/l. Respecto del medio con peptona de colágeno, a las 72 h no se encontró diferencia significativa entre los hongos ( $p \geq 0,05$ ) (fig. 1). La viabilidad de las blastosporas recuperadas en tierra de diatomeas como soporte no mostró diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los hongos crecidos en los distintos medios de cultivo. El porcentaje de germinación para el medio con casaminoácidos fue del 40-51%, mientras que para el de peptona de colágeno fue del 55-56% (fig. 2).

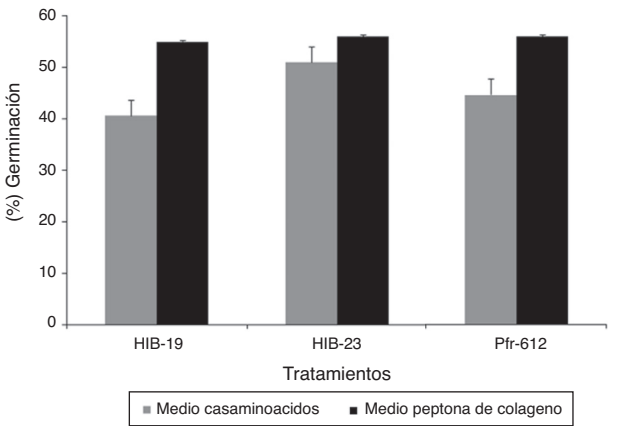
**Tabla 2** Blastosporas de *Isaria fumosorosea* obtenidas en cultivo líquido a diferentes tiempos de incubación en medio casaminoácidos y peptona de colágeno

Clave	Blastosporas/ml		
	Medio casaminoácidos		Medio peptona de colágeno
	48 h	72 h	72 h
HIB-19	$2,2 \times 10^7$	$3,70 \times 10^8$	$6,80 \times 10^6$
HIB-23	$3,50 \times 10^7$	$4,90 \times 10^8$	$2,15 \times 10^7$
Pfr-612	$2,7 \times 10^7$	$2,35 \times 10^8$	$1,55 \times 10^7$
Media $\pm$ EE <sup>a</sup>	$2,65 \pm 0,06 \times 10^7$	$3,75 \pm 0,06 \times 10^8$	$1,30 \pm 0,14 \times 10^7$

<sup>a</sup> Valores promedio y errores estándar.



**Figura 1** Biomasa seca de *Isaria fumosorosea* recuperada a partir del cultivo en medio casaminoácidos y medio peptona de colágeno. Los tratamientos con diferente letra son estadísticamente significativos (Tukey  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 2** Supervivencia de blastosporas de *I. fumosorosea* formuladas en tierra de diatomeas al 5% (p/v).

**Producción de conidios en fermentación sólida.** La producción de conidios en grano de arroz (*O. sativa* L.) fue  $10^8$  a  $10^9$  conidios/g, y existió diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los hongos evaluados. El valor mínimo de  $6,69 \times 10^8$  conidios/g se registró para el aislado HIB-29 y el máximo de  $1,58 \times 10^9$  conidios/g para la cepa Pfr-612 (tabla 3). Los valores de germinación en promedio fueron superiores al 90% a las 4 semanas de almacenamiento.

**Tabla 3** Conidios de *Isaria fumosorosea* obtenidos mediante fermentación sólida y cultivo bifásico

Clave	Conidios/g	
	Fermentación sólida	Cultivo bifásico
HIB-19	$1,26 \times 10^9$ ab	$5,69 \times 10^5$ a
HIB-23	$9,30 \times 10^8$ ab	$7,50 \times 10^6$ b
HIB-29	$6,69 \times 10^8$ a	$4,77 \times 10^6$ b
HIB-30	$1,24 \times 10^9$ ab	$9,00 \times 10^6$ b
Pfr-612	$1,58 \times 10^9$ b	$8,13 \times 10^5$ a
Media $\pm$ EE <sup>a</sup>	$1,09 \pm 0,03 \times 10^9$	$2,75 \pm 0,10 \times 10^6$

Los tratamientos con diferente letra son estadísticamente significativos (Tukey  $p \leq 0,05$ ).

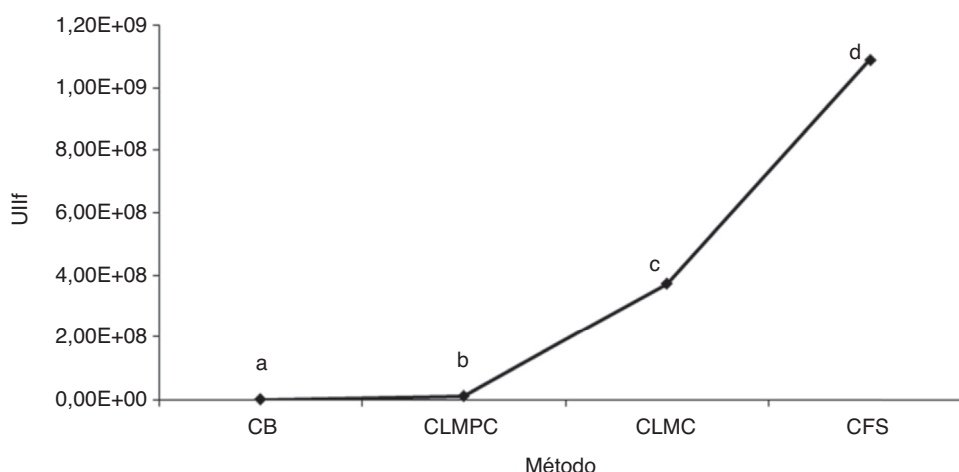
<sup>a</sup> Valores promedio y errores estándar.

**Producción de conidios en cultivo bifásico.** La producción de conidios en cultivo bifásico fue de  $10^5$  a  $10^6$  conidios/g y hubo diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los hongos evaluados. El valor mínimo de  $5,69 \times 10^5$  conidios/g se registró para el aislado HIB-19 y el máximo de  $9,00 \times 10^6$  conidios/g para el aislado HIB-30 (tabla 3). Los valores de germinación en promedio fueron superiores al 90% a las 4 o semanas de almacenamiento.

**Comparativo final de la producción de unidades infectivas de *I. fumosorosea* según el método y el aislamiento.** Se observó diferencia significativa entre los métodos empleados ( $p \leq 0,05$ ): mientras que la fermentación sólida resultó ser el procedimiento más efectivo para la producción de unidades infectivas de *I. fumosorosea*, con un promedio de  $1,09 \times 10^9$  conidios/g, el cultivo bifásico resultó el menos efectivo, con un promedio de  $2,75 \times 10^6$  conidios/g. De los medios de cultivo líquidos, el medio con casaminoácidos registró una producción de  $3,74 \times 10^8$  blastosporas/ml y el medio con peptona de colágeno  $1,31 \times 10^7$  blastosporas/ml. La producción promedio por aislado fue del orden de  $10^7$  blastosporas/ml, y no se registró diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre los hongos evaluados (fig. 3).

En el presente estudio se utilizaron 3 diferentes técnicas para la propagación masiva de aislados nativos de *I. fumosorosea*. La propagación en medio líquido provee ciertas ventajas sobre otras metodologías, como la reducción de los tiempos de producción y la menor contaminación del medio. En el presente estudio se utilizaron 2 medios líquidos para la producción de blastosporas, con diferente fuente de nitrógeno, casaminoácidos y peptona de colágeno, y se





**Figura 3** Comparativo de la producción de unidades infectivas de *Isaria fumosorosea* mediante 3 métodos de propagación.

Los tratamientos con diferente letra son estadísticamente significativos (Tukey  $p \leq 0,05$ ).

CB: cultivo bifásico; CLMPC: cultivo líquido- medio peptona de colágeno; CLMC: cultivo líquido-medio casaminoácidos; CFS: cultivo en fermentación sólida; UIIf: unidades infectivas de *Isaria fumosorosea*.

obtuvieron valores de hasta  $10^8$  blastosporas/ml con la primera fuente y de  $10^7$  blastosporas/ml con la segunda. En estudios anteriores<sup>16</sup> en un medio con casaminoácidos, con la misma proporción de carbono y nitrógeno que la utilizada en este trabajo, pero luego de 96 h de incubación, se obtuvieron valores de hasta  $8,90 \times 10^8$  blastosporas/ml, mientras que en el presente estudio se llegó a  $4,90 \times 10^8$  blastosporas/ml a las 72 h de incubación.

En estudios recientes<sup>27</sup> realizados con aislados de *I. fumosorosea* procedentes de Brasil y EE. UU. se informan valores superiores a  $1 \times 10^9$  blastosporas/ml utilizando hidrolizado ácido de caseína y harina de semillas de algodón (25 g/l) como fuentes de nitrógeno, y glucosa (100 g/l) como fuente de carbono. Respecto del medio con peptona de colágeno, la producción se mantuvo en el orden de  $10^7$  blastosporas/ml a las 72 h de incubación, lo cual contrasta con estudios anteriores<sup>35</sup>, en los que se reporta a las 72 h una producción de  $8,90 \times 10^8$  blastosporas/ml para la cepa GHA de *Beauveria bassiana* en un medio que contenía 80 g/l de glucosa y 12 g/l de peptona de colágeno. Sin embargo, *I. fumosorosea* parece preferir otras fuentes de nitrógeno, diferentes de la peptona de colágeno y el extracto de levadura utilizados en este estudio. La variedad de resultados al comparar diferentes ensayos de producción de blastosporas parece corroborar lo citado en otros trabajos<sup>24</sup>, donde se señala que la calidad y la cantidad de propágulos obtenidos durante la producción en masa de hongos entomopatógenos son dependientes de varios factores, tales como los aislados en sí, los nutrientes, la densidad del inóculo y las condiciones ambientales.

En lo concerniente a la producción de biomasa, solo cuando se cultivaron en el medio con casaminoácidos se verificó una diferencia significativa en favor de la cepa Pfr-612, que produjo 13,50 g/l, mientras que en el medio con peptona de colágeno no hubo diferencias significativas entre los hongos evaluados, lo cual guarda relación con los resultados de producción de blastosporas.

La tasa de germinación de las blastosporas se ubicó entre el 40 y el 56% utilizando, tierra de diatomeas como soporte. Esto está en consonancia con un estudio<sup>34</sup> en el que

reportan una viabilidad de hasta un 69,6% en un medio con casaminoácidos y de 21,9% en un medio con peptona de colágeno para blastosporas de *I. fumosorosea* con tierra de diatomeas al 5%. En ese estudio concluyen que el medio de producción y el soporte usados durante el secado pueden afectar a la tolerancia a la desecación y la estabilidad en el almacenamiento de las blastosporas. Una investigación reciente<sup>27</sup> corrobora esta observación, al reportar una mayor supervivencia (82,4% de germinación) de las blastosporas formuladas en tierra de diatomeas al 7,5% que en un medio de hidrolizado ácido de caseína y glucosa.

Por otro lado, la producción de *I. fumosorosea* por la técnica de cultivo bifásico fue de solo  $10^5$  a  $10^6$  conidios por gramo, lo cual contrasta con los rendimientos obtenidos tanto en el cultivo líquido como en la fermentación sólida. Estos bajos rendimientos pueden atribuirse a varios factores, entre ellos el medio utilizado para la producción de micelio en la fase líquida, así como el sustrato utilizado para la fase sólida. En este estudio, en el que se utilizó caldo dextroso Sabouraud para la fase líquida, es posible que la caseína del medio no haya sido metabolizada correctamente por los hongos evaluados, o que la cantidad de glucosa disuelta haya sido insuficiente. Por otra parte, aunque el grano de arroz es uno de los sustratos preferidos para la producción masiva de hongos entomopatógenos, este no siempre resulta ser la mejor opción. En algunos hongos, como *Lecanicillium lecanii*, la cantidad de conidios puede disminuir debido a la alta compactación que ejerce el hongo sobre el arroz, lo que impide la aireación interna y reduce la producción conidial<sup>6</sup>.

La estructura del sustrato puede ser tan importante como la cantidad de nutrientes disponibles, ya que un sustrato ideal debe proveer una alta proporción entre el área superficial y el volumen, donde las partículas individuales se mantienen separadas con el fin de proporcionar espacio para la aireación y la formación de conidios<sup>25</sup>. En este estudio con *I. fumosorosea*, el grano de arroz utilizado presentó tendencia a permanecer compactado una vez que se inoculó la fase líquida. En otro estudio<sup>28</sup> mencionan que existen también

otros aspectos importantes que se deben tener en cuenta durante la inoculación de la fase sólida, como la duración de la incubación de la fase líquida. En este sentido, tras una incubación líquida prolongada se produce una considerable cantidad de micelio, que después de las 96 h puede derivar en la formación de grandes cantidades de *pellets* miceliales. Estos *pellets* disminuyen el número de puntos de colonización en la fase sólida y retrasan el desarrollo fúngico sobre el medio, ya que no permiten la cobertura total de las partículas del sustrato<sup>19</sup>. Aunque en el presente estudio no se observó la formación de *pellets* miceliales de gran tamaño, no se descarta su presencia, ya que la fermentación líquida se llevó a cabo durante 72 h, período muy cercano al tiempo límite para evitar su formación.

Es probable que el caldo dextrosa Sabouraud utilizado para la propagación durante la fase líquida del cultivo bifásico haya favorecido solo la formación de abundante micelio y no de las blastosporas que se esperaba que se formaran. Otra de las razones por las que el cultivo bifásico fue poco efectivo tal vez sea la composición química del sustrato utilizado para la propagación, es decir el grano de arroz. Como se ha indicado ya, uno de los aspectos importantes para la producción de hongos entomopatógenos es la composición química del sustrato de crecimiento para establecer su contenido de carbono y su relación carbono-nitrógeno (C:N). Dado que, en general, se emplean productos o residuos de origen vegetal, sus nutrientes pueden ser variables a lo largo del año y esta variación puede afectar en gran medida a los parámetros de producción. Si bien no hay sustratos estándar en el mercado, un análisis previo de nutrientes podría ayudar a controlar estas variables y es recomendable realizarlo para asegurar la calidad de los sustratos<sup>28</sup>. Por otro parte, se sabe que medios enriquecidos, tanto en nitrógeno como en carbono, favorecen la producción de biomasa; sin embargo, se debe considerar que un mayor crecimiento micelial no necesariamente conlleva una alta producción de conidios<sup>29</sup>. Estudios anteriores<sup>30</sup> señalan que la esporulación y el crecimiento del micelio pueden verse favorecidos por la presencia de monosacáridos, como glucosa o fructosa. Sin embargo, no todas las fuentes de nitrógeno parecen favorecer estos procesos: aminoácidos como la asparagina y otros compuestos amoniacales pueden acumularse durante el crecimiento somático y alcalinizar el medio e inhibir los procesos de conidiación y crecimiento.

Otro estudio<sup>8</sup> menciona que para inducir el proceso de esporulación en hongos es necesario que la fuente de carbono se encuentre en abundancia y el contenido de nitrógeno sea el factor limitante del crecimiento. Por otro lado, en el caso de la formación de blastosporas, en estudios anteriores<sup>18</sup> se demostró que eran necesarias altas concentraciones de glucosa, de hasta 20 g por litro, para obtener el rendimiento máximo en la formación de blastosporas, y que la tolerancia a la desecación dependía del contenido de casaminoácidos, es decir, de la fuente de nitrógeno, la cual a concentraciones de hasta 40 g por litro permite obtener una tolerancia a la desecación óptima. En ese mismo estudio se demostró que la producción de blastosporas de diferentes cepas de *I. fumosorosea* en medio con casaminoácidos ocurre rápidamente antes de que se agoten los casaminoácidos o la glucosa. Estos resultados se apoyan en estudios realizados con varios aislamientos de *I. fumosorosea* y otros hongos entomopatógenos, que muestran que, a diferencia

del proceso de conidiación, la formación de blastosporas no siempre depende del agotamiento de nutrientes.

Finalmente, cabe señalar que en el presente trabajo, la fermentación sólida resultó ser la técnica con mejores resultados, ya que los rangos de producción fueron de hasta  $10^9$  conidios por gramo, lo cual coincide con los resultados de trabajos previos<sup>9</sup> en los que se obtuvieron rendimientos de hasta  $6,94 \times 10^9$  conidios/g utilizando grano de arroz como sustrato durante 12 días de incubación. En otro estudio<sup>1</sup>, reportaron para *Trichoderma* sp. en cascarilla de algodón enriquecida con solución de melaza al 1%-urea 1% (5:1) y en cascarilla de algodón al 60% y semillas de *Artocarpus incisa* al 40%, utilizando procesos de fermentación sólida artesanal y semiindustrial, concentraciones de  $2,53 \times 10^9$  y  $2,31 \times 10^9$  conidios/g, respectivamente.

Estos resultados en diferentes géneros de entomopatógenos muestran la factibilidad de producir conidios mediante la técnica de fermentación sólida. Sin embargo, el tiempo requerido para la esporulación en sustratos sólidos es generalmente de semanas y el proceso es laborioso, lo que puede resultar en un alto riesgo de contaminación, con el consiguiente aumento de los costos de producción. La tecnología por fermentación líquida puede superar estos inconvenientes logrando que sea más económico escalar el proceso de producción para producir propágulos fúngicos bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas. Debido al corto tiempo de fermentación, la facilidad de recuperación del producto, la automatización del proceso y la disponibilidad de componentes de medios económicos, la fermentación líquida se considera el método más rentable para producir agentes fúngicos de biocontrol<sup>18</sup>, aunque cabe mencionar que los hongos entomopatógenos poseen una amplia variabilidad genética, por lo que dependiendo de la cepa o el aislado, pueden responder de diferente manera cuando se cultivan en medios líquidos. Esta variante debe considerarse para evaluar y optimizar los parámetros de producción del cultivo líquido<sup>23</sup>, además de que la elección de una técnica o un método de producción va a depender de diversos factores, como, por ejemplo, el género y la especie en particular del entomopatógeno, el tipo de propágulo que se quiere obtener y el insecto plaga al cual va dirigido el producto, solo por mencionar algunos de los aspectos más importantes por considerar.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la factibilidad de producir propágulos de *I. fumosorosea* bajo diferentes técnicas de propagación. La fermentación en cultivo líquido mostró marcadas diferencias entre los medios utilizados en la producción de blastosporas por mililitro; sin embargo, fueron similares en los porcentajes de viabilidad obtenidos, así como en la biomasa recuperada, la cual estuvo acorde con la concentración de blastosporas. La producción de conidios en fermentación sólida fue el método con el que se obtuvieron los mejores resultados, ya que la producción de unidades infectivas de *I. fumosorosea* con ese método superó a la de la fermentación líquida y a la del cultivo bifásico; que fue el método que mostró los menores rendimientos por gramo de sustrato. Estos resultados muestran el potencial de *I. fumosorosea* para producir propágulos

bajo diferentes condiciones, lo que contribuye a pensar en su posible uso en programas de manejo y control de plagas de importancia agrícola de la región, como *Diaphorina citri*, pero es necesario continuar con la evaluación de la estabilidad en el almacenamiento de cada uno de estos propágulos.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Agamez-Ramos EY, Zapata-Navarro RI, Oviedo-Zumaqué LE, Barrera-Violeth JL. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Rev Colomb Biotecnol.* 2008;2:23–34.
- Asaff A, Escobar F, de la Torre M. Culture medium improvement for *Isaria fumosorosea* submerged conidia production. *Biochem Eng J.* 2009;47:87–92.
- Behle RW, García-Gutiérrez C, Tamez-Guerra P, McGuire MR, Jackson MA. Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Southwest Entomol.* 2006;31:289–95.
- Bidochka M, Low N, Khachatourians GG. Carbohydrate storage in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:3186–90.
- Carr A, Elósegui O, Padrón NB. Reproducción de dos cepas nativas del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, sobre diferentes soportes líquidos y sólidos. *Fitosanidad.* 2003;4:7–11.
- Cortez-Madriral H. Producción de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. 33. *Agr Tec Mex.*; 2007. p. 83–7.
- De Faria MR, Wraight SP. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control.* 2007;43:237–56.
- Elósegui O. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Ciudad de La Habana: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV); 2006. p. 61.
- Espinosa-Ayala GE, Rivas-Morales C, Arévalo-Niño K, Oranday-Cárdenas A, Cruz-Vega DE, Castro-Garza J, Carranza-Rosales P. Diseño de un medio de cultivo para células de mamífero utilizando fuentes alternativas de nitrógeno y vitaminas. *Rev Mex Ing Quim.* 2007;6:243–9.
- Figuerola LM, Varela A, Corredor D. Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Rev Invest Universidad La Salle.* 2007;7:127–31.
- Galán-Franco LA, Morales-Loredo A, Álvarez-Ojeda G, López-Arroyo JI, Arévalo-Niño K, Sandoval-Coronado C, Quintero-Zapata I. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of Mexico. *Southwest Entomol.* 2011;36:443–9.
- Gandarilla-Pacheco FL, Galán-Wong LJ, López-Arroyo JI, Rodríguez-Guerra R, Quintero-Zapata I. Optimization of pathogenicity tests for selection of native strains of entomopathogenic fungi isolated from citrus-growing areas of Mexico on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Fla Entomol.* 2013;96:187–95.
- Goettel MS, Inglis GD. Fungi: Hyphomycetes. En: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in insect pathology.* San Diego: Academic Press, Inc; 1997. p. 213–49.
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of Huanglongbing pathogens. *Annu Rev Entomol.* 2013;58:413–32.
- Griffin DH. *Fungal physiology.* New Jersey: John Wiley & Sons; 1996. p. 472.
- Hegedus D, Bidochka M, Khachatourians G. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1990;33:641–7.
- Jackson MA, Payne A.R. Evaluation of the desiccation tolerance of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) using a lab-scale, air-drying chamber with controlled relative humidity. *Biocontrol Sci Technol.* 2007;17:709–19.
- Jackson MA, McGuire MR, Lacey LA, Wraight SP. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res.* 1997;101:35–41.
- Jaronski S, Jackson MA. Mass production of entomopathogenic hypocreales. En: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in invertebrate pathology.* New York: Academic Press, Inc; 2012. p. 255–84.
- Jenkins NE, Heviefio G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Inform.* 1998;19:21–31.
- Khachatourians GG. Insecticides microbial. En: Schaecter M, editor. *Encyclopedia of microbiology.* New York: Elsevier; 2008. p. 95–110.
- Khachatourians GG, Qazi SS. Entomopathogenic fungi: Biochemistry and molecular biology. En: Brakhage AA, Zipfel PF, editores. *Human and animal relationships, the Mycota VI.* Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. p. 34–53.
- Kleespies RG, Zimmermann G. Production of blastospores by three isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. *Biocontrol Sci Technol.* 1992;2:127–35.
- Leite LG, Batista Filho A, Almeida JEM, Alves SB. Controle de qualidade. En: Leite LG, Batista Filho A, Almeida JEM, Alves SB, editores. *Produção de fungos entomopatógenos.* Ribeirão Preto: Alexandre de Sene Pinto; 2003. p. 92.
- Lomer CH, Lomer CJ, editores. *Mass production of fungal pathogens for insect control: Insect pathology manual.* 2008 [consultado 20 Oct 2016]. Disponible en: <http://www.lubilosa.org>
- Lord JC. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *J Invertebr Pathol.* 2005;89:19–29.
- Mascarin G, Jackson MA, Kobori NN, Warren-Behle R, Delalibera-Júnior Í. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *J Invertebr Pathol.* 2015;127:11–20.
- Mascarin G, Batista-Alves S, Biaggioni-Lopes R. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinose*. *Braz Arch Biol Technol.* 2010;4:753–61.
- Méndez A, del Pozo E, García I. Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Rev Prot Veg.* 2009;24:156–61.



30. Moore E. Fundamentals of the fungi. New Jersey: Prentice Hall; 1996. p. 574.
31. Patt JM, Chow A, Meikle WG, Gracia C, Jackson MA, Flores D, Sétamou M, Dunlap Ch A, Avery PB, Hunter WB, Adamczyk JJ. Efficacy of an autodisseminator of an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea*, to suppress Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, under greenhouse conditions. Biol Control. 2015;88:37–45.
32. Poprawski TJ, Jackson MA. Laboratory activity of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on *Bemisia argentifolii* nymphs. Arthropod Manage Tests. 1999;24:399–400.
33. Roy HE, Steinkraus DC, Eilenberg J, Hajek AE, Pell JK. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annu Rev Entomol. 2006;51:331–57.
34. Sandoval-Coronado CF, Luna-Olvera HA, Arévalo-Niño K, Jackson MA, Poprawski TJ, Galán-Wong L. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. World J Microbiol Biotechnol. 2001;17:423–8.
35. Sandoval-Coronado CF, Quintero-Zapata I, Maldonado-Blanco MG, Elías-Santos M, Galán-Wong LJ. Producción de blastosporas de *Beauveria bassiana* en un medio de cultivo líquido a base de glucosa y peptona de colágena. XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico, 2010, Michoacán, México, Memoria, p. 416-419.
36. Shapiro-Ilan DI, Cottrell TE, Jackson MA, Wood BW. Virulence of *Hypocreales* fungi to pecan aphids (Hemiptera: Aphididae) in the laboratory. J Invertebr Pathol. 2008;99:312–7.
37. Zabriskie DW, Armiger WB, Phillips DH, Albano PA. Traders' guide to fermentation media formulation. Memphis: Traders Protein; 2008. p. 60.
38. Zimmermann G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control. Biocontrol Sci Technol. 2008;18:865–901.