

EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL CRECIMIENTO Y LA ESPORULACIÓN DE *ASCHERSONIA ALEYRODIS* WEBBER EN MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES

Alexis A. Hernández Mansilla¹ y Carmen Rosón Álvarez²

¹ Grupo Científico. Centro Provincial de Meteorología. Marcial Gómez 401 esq. a Estrada, Ciego de Ávila, Cuba, c.e.: ahmansilla@yahoo.es y agro@meteoro.fica.inf.cu

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Central, Extremo Oeste, Ciego de Ávila, Cuba

RESUMEN

Se ejecutó un trabajo en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Ciego de Ávila con el objetivo de obtener un medio adecuado para la conservación de aislamientos de *Aschersonia aleyrodis* Webber. Para ello se dispuso de cultivos monoconidiales de este microorganismo, obtenidos a partir de conidiomas presentes en hojas de naranjo Valencia (*Citrus sinensis* L.) procedentes de la Empresa de Cítricos del municipio de Ceballos. Se seleccionaron los medios de cultivo: agar papa dextrosa (PDA), agar czapek dox (industrial oxid), agar soya, agar sabouraud dextrosa (SDA), (industrial oxid) y agar extracto de malta, en los que se determinó el crecimiento lineal y la concentración de esporas de las colonias. Se determinó que *A. aleyrodis* mantuvo buen crecimiento en todos los medios de cultivo a prueba, a excepción de agar czapek dox, donde no creció. La esporulación en agar papa dextrosa y agar sabouraud dextrosa alcanzó concentraciones de 10⁸ esporas/mL. Ambos medios mostraron buenas posibilidades para su utilización en ceparios de conservación y bancos de cepas.

Palabras clave: medios de cultivo, *Aschersonia aleyrodis*, crecimiento, esporulación

ABSTRACT

With the objective of obtaining an adequate medium for the conservation of *Aschersonia aleyrodis* Webber isolations a research work was executed in Plant Health Laboratory of Ciego de Avila province. In this way it was used monoconidials cultures of the microorganism obtained from conidioms presents in "Valencia" orange (*Citrus sinensis* L) leaves which were collected Ceballos Town Citric Enterprise. Linear growth and spore concentration of colonies were determined in culture media selected: Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek Dox Agar (Industrial Oxid), Soy Agar, Dextrose Sabouraud Agar (SDA), Industrial Oxid) and Malta Extract Agar. *A. aleyrodis* maintained good growth in all medias except in Agar Czapeck Dox where it did not. Sporulation in PDA and SDA reached a concentration of 10⁸ spores/mL. Both culture media showed good possibilities for their use in culture collections and strains banks.

Key words: culture media, *Aschersonia aleyrodis*, growth, sporulation

INTRODUCCIÓN

El control biológico representa el método más económicamente viable, ecológicamente recomendable y autosostenido del control de plagas insectiles, y constituye la mejor y única forma de mantener su equilibrio en los diferentes cultivos, con una diversidad de controles naturales [Altieri *et al.*, 1989; Altieri, 1991].

En Cuba se emplean varios hongos entomopatógenos como elementos de control para plagas de relevancia económica, como *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus*, los que refuerzan la acción de los enemigos naturales. Mundialmente existen otros hongos patógenos a insectos, dentro de los que *Aschersonia aleyrodis* Webber tiene gran relevancia como biorregu-

lador de plagas dañinas en cultivos de importancia, y especialmente con gran eficacia sobre *Trialeurodes vaporariorum* en invernaderos [Fransen, 1987], insectos dañinos a las hortalizas [Messias, 1992] y mosca blanca (*Dialeurodes* spp.) en los cítricos [Osborne y Landa, 1999].

En la actualidad, y fundamentalmente en Cuba, existe poca información sobre aspectos biológicos de *Aschersonia aleyrodis* Webber, aún más en lo referente a su comportamiento en medios de cultivo; sin embargo, estos aspectos constituyen un antecedente muy importante en su caracterización, a la vez de constituir una base para la elaboración de tecnologías de producción de bioplaguicidas, ya que mediante la selección de

un medio adecuado se garantiza la conservación de los aislamientos, bancos de cepas y preinóculos sobre los que el microorganismo debe tener un rápido desarrollo y una alta capacidad de esporulación, por lo que la determinación de un medio idóneo para la conservación de *A. aleyrodis* capaz de cumplir los requisitos anteriores constituye el objetivo fundamental de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos se realizaron en la sección de Micología del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Ciego de Ávila. En la realización de los ensayos se emplearon aislamientos monoconidiales de *Aschersonia aleyrodis* Webber procedentes de conidiomas existentes en hojas de Naranja valencia (*Citrus sinensis* L.) colectadas en la Empresa de Cítricos de Ceballos. Se evaluaron los medios de cultivos agar papa dextrosa (PDA), agar czapek dox (industrial oxoid), agar soya, agar sabouraud dextrosa (SDA) (industrial oxoid) y agar extracto de malta. Su selección se basó en criterios acerca del cultivo de entomopatógenos [Cabrera, 1995; Herrera, 1985; Lujan, 1990].

En este ensayo se dispuso de 10 placas de Petri para cada medio de cultivo, en las que se sembraron ponchetes de 10 mm de diámetro del hongo, de un cultivo de ca-

torce días, sembrado por dispersión. Posteriormente se evaluó el crecimiento radial de las colonias a los tres, cinco, siete, diez y veintidós días, para lo que se midió el tamaño en milímetros de su diámetro mediante una regla graduada, y se descontó el tamaño del ponchete. Se determinó además la capacidad de esporulación a través de conteo de conidios por mililitro en suspensión, para lo que se tomaron cinco ponchetes de 10 mm del crecimiento, se depositaron en un tubo con 10 mL de agua destilada estéril, se agitó, se tomó una alícuota de 1 mL de la suspensión y se prepararon diluciones seriadas de 10^2 , para finalmente tomar 0,5 mL y depositar en una cámara de Newbauer para su contabilización. Los resultados se tabularon mostrando el tamaño medio del diámetro de las colonias y los niveles de concentración de esporas obtenidos en cada medio de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mejores resultados en el crecimiento se corresponden con agar papa dextrosa, agar sabouraud dextrosa y agar soya, con un rango en el diámetro de sus colonias de 9-16, 9-15 y 10-15 mm respectivamente, a diferencia de agar extracto de malta, donde el hongo solo alcanzó un crecimiento entre 5-9 mm. Todos ellos muestran una gran diferencia con agar czapek dox, donde no se observó crecimiento en sus colonias (Tabla 1).

Tabla 1. Crecimiento y concentración de esporas de *A. aleyrodis* en diferentes medios de cultivos

Medios de cultivos	Diámetro de las colonias (mm)	Concentración esporas/mL
Agar papa dextrosa	9-16	10^8
Agar czapek dox	0	0
Agar extracto de malta	5-9	10^5
Agar soya	10-15	10^7
Agar sabouraud dextrosa	9-15	10^8

Respecto al comportamiento de la capacidad de esporulación que manifestó *A. aleyrodis* en los distintos medios de cultivo, se puede observar que las concentraciones más elevadas coinciden con los medios de mayor crecimiento, agar sabouraud dextrosa, agar papa dextrosa y agar soya, con concentraciones de 10^8 , 10^8 y 10^7 respectivamente. Difiere de la misma forma agar extracto de malta, en el que solo se alcanzó una concentración de 10^5 esporas/mL (Tabla 1).

Los medios de cultivo, por su composición, influyen en el desarrollo y la esporulación de los hongos. Estos

microorganismos requieren para su metabolismo fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, hierro, sodio, potasio y otros minerales. De todos, la fuente principal de materia prima la constituye el carbono [Martínez, 1982]. No obstante, la selección de los medios de cultivo en la mayoría de los casos se realiza de forma empírica y no atendiendo a su exacta composición y acción [Frobisher, 1976].

Al respecto, y específicamente en el caso de *A. aleyrodis*, se plantea que puede llegar a tener un crecimiento exitoso en diferentes tipos de medios [Berlanga y Hernández, 2004]. También Berger (1920, citado por

Berlanga y Hernández, 2004) plantea que en medio a base de PSA (agar papa sacarosa) obtuvo concentraciones de 8×10^6 esporas/cm² [Fransen, 1987, citado por Berlanga y Hernández, 2004]. Gottwald, en 1978, al utilizar el medio GPP, obtuvo $5,8 \times 10^{10}$ esporas/cc, además de referencias respecto al empleo de saboraud glucosa a 2% más extracto de levadura, que muestra resultados similares a los anteriores, específicamente para este medio de cultivo. Otros resultados acerca de la producción masiva de este hongo plantean que *A. aleyrodis* puede reproducirse en un medio compuesto fundamentalmente por arroz, extracto de levadura, extracto de malta y tetraciclín, en que se alcanza concentraciones de $1,3 \times 10^4$ esporas/mL a temperatura de 28°C por cuarenta y dos días [Garza, 1977].

Los índices de crecimiento y esporulación que se muestran en este trabajo en los medios de agar papa dextrosa y agar saboraud dextrosa resultan alentadores para los fines de conservación de aislamientos, e incluso para bancos de cepas, aún más al cumplir con los requisitos exigidos por la NC 72 02 (1993), en el que se plantean que deben ser superiores a 10^8 para la producción de cepas de hongos entomopatógenos, en este caso a excepción de los resultados en agar soya, donde la concentración de esporas es ligeramente inferior (10^7 conidios/mL); sin embargo, constituye una posibilidad más como una reserva para momentos cuando se carezca de los más idóneos.

No obstante, las diferencias del comportamiento en el crecimiento y esporulación en los hongos están sujetas al tipo, a la composición del medio y a la asimilación específica de los nutrientes disponibles en relación con su metabolismo, aspecto al que responden de forma particular los microorganismos, e incluso pueden tener variaciones. A esto se agrega que medios no sintéticos poseen una composición química ignorada, como por ejemplo extractos de carne, levaduras, infusión de carne, sangre, suero de caseína, en los que es prácticamente imposible la preparación de dos lotes idénticos de un mismo medio con productos de distinta procedencia [Mayea, 1981], aspecto que puede repercutir en este comportamiento fundamentalmente para el caso de los resultados mostrados en agar soya.

CONCLUSIONES

- *A. aleyrodis* Werbbber alcanzó mayor crecimiento en agar papa dextrosa (9-16 mm), agar soya (10-15 mm) y agar saboraud dextrosa (9-15 mm).

- Las concentraciones de esporas más elevadas se obtuvieron en los medios de cultivo agar papa dextrosa y agar saboraud dextrosa con niveles de 10^8 esporas/mL.
- Agar papa dextrosa y agar saboraud dextrosa presentan buenas posibilidades para la conservación de aislamientos de *A. aleyrodis* y confección de ceparios.

REFERENCIAS

- Altieri, M.; J. Trujillo; L. Camos; C. Klein-Kuch; C. S. Gold; J. R. Quesada: «El control biológico clásico en América Latina en su contexto histórico», *Manejo Integrado de Plagas*, Costa Rica, 12:82-107, 1989.
- Altieri, M. A.: «How Can Best We Use Biodiversity in Agroecosystems», *Outlook on Agriculture*, 20:15-23, 1991.
- Berlanga, P. Angélica María; V. Hernández Velásquez: «*Aschersonia aleyrodis* Webber en el control microbial de mosca bancla de los cítricos *Dialeurodes* spp.», Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, DGSV-SAGAR, Estación FFCC, Tecmán, Colima, México, 2004, <http://www.procesosvirtuales.com/documentos/archivos/DT-BT01-001.pdf>, 2004.
- Cabrera, I.: «Un medio a base de soya más azúcar para la producción de *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* medio líquido». III Encuentro Nacional Científico-Técnico de Bioplaguicidas, INISAV, La Habana, 1995.
- Fransen, J. J.: «Control of Greenhouse White Fly, *Trialetrodes vaporariorum*, by the Fungus *Aschersonia aleyrodis*. Integrated control in Glass House», Budapest, *Bulletin SROP* (France), V. 10 (2):57-61, Apr. 1987.
- Frobisher, M.: *Microbiología. Introducción a los microorganismos como una referencia especial a los Procariones*, Barcelona, 1976.
- Garza, G. E.: «Combate biológico de la mosca de los cítricos (*Dialeurodes citri*) por el hongo entomopatógeno *Aschersonia* spp. en el estado de Colima». V Reunión Nacional de Control Biológico y Sector Agropecuario, Victoria Tams, 1977.
- Gottwald, A. C.: «Biotécnica de aislamientos y reproducción masiva a nivel de laboratorio de especies del hongo *Aschersonia aleyrodis* nativo de México». Memorias VI Reunión Nacional de Control Biológico, Culiacán, México, 1978.
- Herrera, A. G.: *Manual de medios de cultivo*, Ed. Ciencia y Técnica, La Habana, 1985.
- Luján, Mercedes: «Metodología de propagación bifásica o líquida estática del hongo *Verticillium lecanii* (Limm)», INSAV, La Habana, 1990.
- Martínez, S. J.: *Microbiología general*, Ed. Pueblo y Educación, La Habana, 1982.
- Mayea, S.: *Microbiología agrícola*, Ed. Pueblo y Educación, La Habana, 1981.
- Messias, C. L.: «Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle biológico das pragas agrícolas». Ciclo de palestras sobre controle biológico de pragas, 2. Campinas. Anais. Campinas: Fundação Cargill, 1992.
- Norma Cubana 72-02: «Biopreparados entomopatógenos. Métodos de ensayos», Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INSV), La Habana, 1993.
- Osborne, L. S.; Z. Landa: «Biological Control of Whiteflies whit Entomopathogenic Fungi», Fla. Entomol. Winter Haven, Fla., Florida Entomological Society, V. 75 P, Dec. 1999.