

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL Y CONIDIACION DE CEPAS NATIVAS DE *Hirsutella citriformis*

Georgina Cruz-Juárez¹, María Guadalupe Maldonado-Blanco¹, Myriam Elías-Santos¹, Raúl Rodríguez-Guerra², María del Socorro Flores González¹ y Carlos Francisco Sandoval-Coronado¹. Instituto de Biotecnología, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Ciudad Universitaria, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza Nuevo León. georgina_cruzjuarez@yahoo.com.mx.

RESUMEN: Se evaluó el crecimiento radial de distintas cepas de *Hirsutella* sobre el medio PDA a temperatura de $25^{\circ} \pm 2$ durante 50 días, la tasa diaria de crecimiento radial varió de 0.058 a 0.073mm/día, con el más alto desarrollo en la cepa de Yucatán, no se observó crecimiento conidial sobre PDA debido a esto se realizaron subcultivos en medio PDA con extracto de levadura al 0.5%. Se obtuvo la mayor producción de conidios en la cepa de Yucatán 4.90×10^5 /ml. Además se probaron arroz, trigo y avena para la producción de conidios por el método bifásico en las cuatro cepas (Colima, Tabasco, Yucatán y Veracruz) se obtuvo mayor concentración de conidios para Colima en avena con 9.33×10^6 conidios/ml. La cepa de Yucatán presentó porcentaje de germinación de 93% a las 96 h en el medio PDA más extracto de levadura al 0.5%.

Palabras clave: *Hirsutella citriformis*. germinación, conidia, Huanglongbing, crecimiento micelial.

Evaluation of radial growth and conidiation of native strains of *Hirsutella citriformis*

ABSTRACT: This study evaluated the radial growth of different strains of *Hirsutella* on PDA medium, incubated at $25^{\circ} \pm 2$ during 50 days. The radial growth rates varied between 0.058 and 0.073mm/day, with the highest growth for Yucatan strain, without formation of conidia on PDA, after were performed subcultures on PDA medium with yeast extract 0.5%. Conidial production presented values from 2.10×10^5 to 4.90×10^5 . The production of conidia on three different substrates was also evaluated by the biphasic method in the four strains (Colima, Tabasco, Yucatan and Veracruz). Colima strain in oatmeal produced the highest concentration of conidia of 9.33×10^6 /ml. The germination percentage was determined for Yucatan strain in PDA and PDA with yeast extract, with 93% germination at 96 h without significant difference on the two media employed.

Key words: *Hirsutella citriformis*. germination, conidia, Huanglongbing, mycelial growth.

Introducción

En la actualidad el Huanglongbing es una de las peores enfermedades de los cítricos que causa grandes pérdidas. El HLB es causado por la bacteria *Candidatus liberibacter* y transmitido por el liviido *Diaphorina citri* Kuwayama (Bove, 2006). Una de las metodologías que ha recibido mayor atención para el control de este vector es mediante la aplicación de depredadores y parasitoides (González-Hernández, *et al* 2011) y también hongos entomopatógenos como *Isaria fumosorosea* (Subandiyah *et al.*, 2000), *B. bassiana* (Rivero-Aragon y Grillo-Ravelo, 2000) y también *Hirsutella citriformis* (Subandiyah *et al.*, 2000; Étienne *et al.*, 2001, Cabrera, *et al.*, 2004, Hall, *et al.*, 2012) que se ha encontrado en forma natural infectando a este insecto. *Hirsutella* tiene como desventajas su lento crecimiento y baja producción de conidios, esto le resta ventajas en comparación con otros agentes de control biológico de más rápido crecimiento, por lo cual se necesita mejorar estas características de interés para poder ser utilizado eficientemente. El interés en el uso de *Hirsutella citriformis* para el control biológico del liviido *D. citri* radica en las características de que se le ha encontrado infectando naturalmente al insecto y al parecer son hongos con alta especificidad hacia el insecto blanco.

Materiales y Método

Se utilizaron ocho cepas monoconidiales de *Hirsutella citriformis* aisladas por Pérez-González, *et al.*, (2012). Las cepas se cultivaron en medio papa dextrosa agar (PDA) y PDA más extracto de levadura al 0.5% donde se evaluó la tasa de crecimiento radial a partir de la colocación de un disco circular de 5 mm con el cultivo original y colocándolo en el centro de la placa, con cinco repeticiones por cepa, se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 a 6 semanas, Las mediciones se realizaron por el reverso de la caja desde el día ocho hasta que cubrió completamente la superficie de la placa. Se cuantificó también la producción de conidios a partir de un cultivo en medio PDA más extracto de levadura al 0.5% con 6 semanas de crecimiento, se adicionó 10 ml de agua destilada esteril y se agitó alrededor de 5 minutos para el desprendimiento de los conidios. Se realizó el recuento de conidios en cámara de Neubauer. Además, se evaluó la producción de conidios de cuatro cepas (Colima, Tabasco, Yucatán y Veracruz) en tres sustratos sólidos: sorgo, avena y arroz. Se lavaron separadamente y se colocaron 50 g de cada sustrato en frascos de vidrio con tapa de aproximadamente 500 g de capacidad; para cada uno se realizaron 3 repeticiones. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 minutos. Cada uno de los frascos se inoculó con 10 ml de una suspensión de blastosporas crecida en medio líquido de casaminoácidos (Jackson *et al.* 1997) después de 7 días de agitación a 250 rpm y mantenido a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. En los experimentos se empleó un diseño estadístico bifactorial (cepa x sustrato) con cinco repeticiones. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias mediante Tukey ($p < 0.05$). Para la evaluación de germinación de conidios, se realizó mediante un raspado de los sinemas de *Hirsutella* con una asa bacteriológica para llevar conidios los cuales fueron sembrados por triplicado en cajas petri con PDA y PDA más extracto de levadura 0.5% las cuales se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y cada 24 horas se cortaron fragmentos de 1cm^2 de cada medio y se agregó una gota de azul de lactofenol para observar la germinación. Se realizaron observaciones bajo el microscopio y se determinó el porcentaje de conidios germinados, se contaron 100 conidios y se registró el número de conidios germinados. Se consideró conidio germinado el que presentara la longitud del tubo germinativo de al menos el tamaño del conidio.

Resultados y Discusión

Los resultados de la evaluación de crecimiento radial de *Hirsutella citriformis* mostraron un lento crecimiento ya que tardaron alrededor de 50 días para cubrir totalmente la caja (Cuadro 1), el análisis de varianza determinó que las cepas de Yucatán, Veracruz y Quintana Roo presentaron significativamente la mayor tasa de crecimiento, mostrando valores de 3.63, 3.67 y 3.60 cm respectivamente en PDA.

Al adicionar extracto de levadura 0.5% se obtuvo una estimulación en el crecimiento ya que se mostró un desarrollo completo de la caja en 35 días, el análisis de varianza determinó que las cepas de Campeche y Yucatán presentaron significativamente la mayor tasa de crecimiento mostrando valores de 3.49 y 3.50cm. Los resultados además demuestran una diferencia significativa en cuanto al crecimiento micelial entre los dos medios utilizados, por lo que se comprueba lo que menciona Prakash (2007) y Pérez-González (2012) que el extracto de levadura es necesario para el crecimiento micelial y producción de conidios. La tasa de crecimiento radial varió de 0.058 a 0.073mm/día siendo Yucatán la que muestra una mayor velocidad de crecimiento de 0.073mm/día, estos valores son similares a los encontrados por Avilés-León (2011), reportando un crecimiento lento en *Hirsutella* (0.67mm/día).

Cuadro 1. Crecimiento radial (cm) de las cepas de *H.citriformis*. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencia significativa entre las cepas (Tukey, p < 0.05).

Cepas <i>H. Citriformis</i>	PDA	PDA + Y	PDA	PDA + Y	PDA	PDA + Y	PDA	PDA + Y	PDA	PDA + Y	PDA	PDA + Y	PDA	PDA
Días	8		14		20		26		32		38	35	44	50
QUINTANA ROO	0.4a	0.73cd	1.07a	1.64de	1.68a	1.74a	2.31a	2.43d	2.77a	3.26ab	3.09a	3.26bc	3.46a	3.60a
CHIAPAS	0.38a	0.96ab	1.02ab	1.89ab	1.58a	1.98b	2.03c	2.89ab	2.49de	3.36a	2.92abc	3.47ab	3.17bc	3.38b
XOLOL	0.35ab	0.70d	0.95bc	1.50e	1.58a	1.59c	2.15b	2.31d	2.65bc	2.93c	2.82c	2.95d	2.98d	3.19c
CAMPECHE	0.28bc	1.00a	0.84c	1.99a	1.43b	2.10d	2.08c	3.04a	2.58bc	3.36a	2.88bc	3.49a	3.02cd	3.36b
TABASCO	0.4a	0.96ab	0.96b	1.73a	1.41d	1.82e	1.75d	2.66c	2.16f	2.95c	2.40d	3.15cd	2.64e	2.88b
VERACRUZ	0.33ab	0.86bc	1.00ab	1.81bc	1.58a	1.90f	2.27a	2.81bc	2.73ab	3.22ab	2.99ab	3.33ab	3.47a	3.67a
COLIMA	0.2c	0.76cd	0.67d	1.70cd	1.18bc	1.77g	1.51e	2.78bc	2.02ge	3.15b	2.29e	3.26bc	2.72e	2.86d
YUCATAN	0.37a	0.98ab	0.75d	1.84ab	1.29cd	1.93h	1.72d	2.85b	2.41bc	3.32ab	2.85bc	3.50a	3.19b	3.63a

El cuadro 2 muestra la producción de conidios en medios de PDA más extracto de levadura al 0.5% donde se observó que la cepa de Yucatán presentó la mayor producción de conidios y difiere significativamente del resto de las cepas. Por otra parte, los porcentajes de germinación de los conidios variaron entre 9.7 y 10.3%, en 24 h hasta 87.3 y 93% a las 96 horas ($F = 451.19$ g.l.=14 $p < 0.01$) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Producción de conidios en medio PDA más 0.5% extracto de levadura. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas (Tukey $p < 0.01$).

Estado	Producción de conidios
San Luis Potosí	2.10×10^5 e
Canpeche	2.70×10^5 d
Veracruz	2.50×10^5 d
Yucatán	4.90×10^5 a
Colima	3.50×10^5 c
Tabasco	3.90×10^5 b
Chiapas	2.43×10^5 e

Cuadro 3. Porcentaje de germinación de la cepa *Hirsutella citriformis* de Yucatan en los medios PDA y PDA más extracto de levadura 0.5%. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas (Tukey, $p < 0.05$).

Horas	PDA	PDA + Y 0.5%
24 horas	10.3 a	9.7 a
48 horas	28.7 a	33.3 a
72 horas	73.3 a	78.0 a
96 horas	87.3 a	93.0 a

Se observó que no hubo diferencia significativa entre los dos medios usados PDA y PDA más 0.5% extracto de levadura ($F = 0.18$ g.l. = 6 $p = 0.892$). Respecto a las evaluaciones con sustratos de arroz, sorgo y avena se observó que la mejor producción fue en avena con una concentración de 9.33×10^6 conidios para la cepa de Colima siguiéndole Yucatán con 8.58×10^6 , las cuales mostraron diferencia significativa respecto a Tabasco y Veracruz ($F = 190.59$ g.l.= 3 $p < 0.01$) para el factor sustrato, ($F = 121$ g.l.= 5 $p < 0.01$) para el factor cepa y $F = 17$ g.l.= 15 $p < 0.01$ para la interacción de los dos factores (Fig. 1), la segunda mayor producción fue para el sustrato arroz con la cepa de Tabasco (7.58×10^6), la cual difirió significativamente con las demás cepas (Fig. 2). La cepa de Yucatán presentó significativamente la mayor producción de conidios desde el día 16 hasta el día 48 en el sustrato sorgo (7.17×10^6) (Fig. 3).

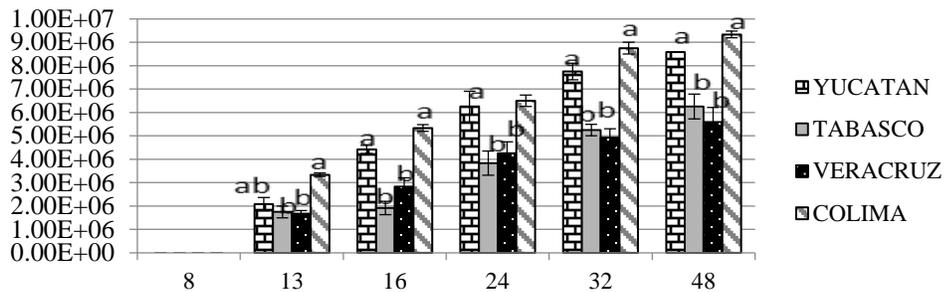


Figura 1. Evaluación de la producción de conidios de *H. citriformis* en el sustrato Avena, durante 48 días. Letras diferentes indican diferencia significativa al nivel de 0.01.

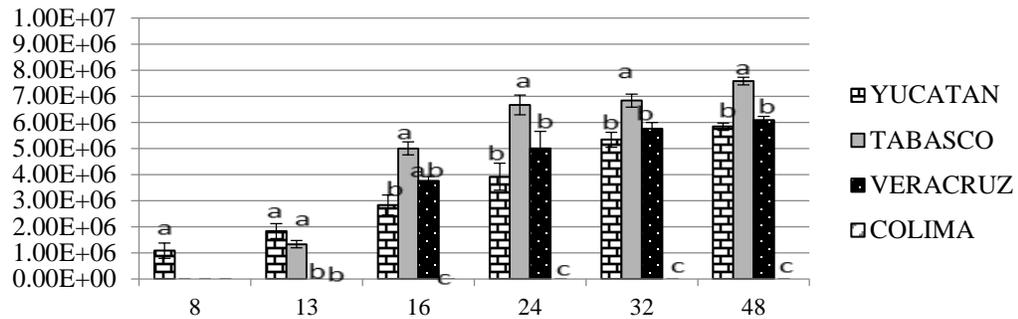


Figura 2. Evaluación de la producción de conidios de *H. citriformis* sobre el sustrato Arroz, durante 48 días. Letras diferentes indican diferencia significativa al nivel de 0.01.

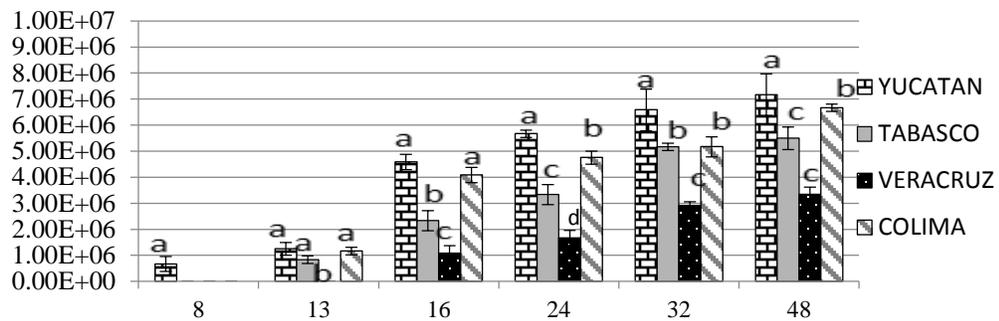


Figura 3. Evaluación de la producción de conidios de *H. citriformis* en el sustrato Sorgo, durante 48 días. Letras diferentes indican diferencia significativa al nivel de 0.01.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos se concluye que el crecimiento micelial y la producción de conidios en las distintas cepas fue estimulado por el extracto de levadura al 0.5%, probablemente por la mayor cantidad de nitrógeno aportado por el extracto, se observó además que *Hirsutella citriformis* de Yucatán alcanzó la máxima producción de conidios de 4.90×10^5 a las 6 semanas.

De acuerdo a las evaluaciones con sustratos se observó que la mejor producción fue con avena presentando concentración de 9.33×10^6 conidios en la cepa de Colima siguiéndole Yucatán con 8.58×10^6 , la segunda mayor producción fue para el sustrato arroz en la cepa de Tabasco 7.58×10^6 . Además se observó que en el sustrato sorgo la cepa Yucatán presentó la mayor producción de conidios 7.17×10^6 . Estos resultados proporcionan los parámetros para caracterizar las cepas silvestres y así posteriormente compararlos con las mutantes obtenidas mediante el procedimiento de transformación que se usará.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación en medio PDA y PDA más extracto de levadura al 0.05%

Agradecimientos

A CONACYT por la beca otorgada y al programa PAICYT-UANL por el apoyo otorgado.

Literatura Citada

- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Path.* 88(1): 7-37
- Brown, J.S. and D.W. Holden. 1998. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. *En: Currents Opinions of Microbiology*. Vol. 1 (1998); p. 390-394.
- Cabrera, R.I., González, C., Hernández, D. y J.L. Rodríguez. 2004. Presencia del Hongo "*Hirsutella citriformis*" sobre "*Diaphorina citri*" Kuw. (Homoptera: Psyllidae) en los cítricos de Cuba. *Levante Agrícola: Revista Internacional de Cítricos*, ISSN 0457-6039. No. 369, 2004, PP. 74-76.
- Étienne, J., Quilici, S., Maribel D y A. Franck 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits* 56:307-315.
- González-Hernández, A., López, A.I.J., Arredondo, H.C., Argumedo, J.J, Contreras, M.L., y M.H. Cabrera-Mireles, 2011. Determinación y distribución de hiperparasitoides asociados a *Diaphorina citri* kuwayama (hemiptera: psyllidae), en México. 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, pp: 365, 369
- Hall, D.G., Hentz, M.G., Meyer, J.M., Kriss, A.B., Gottwald, T.R. and D.G. Boucias. 2012. Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. *BioControl* DOI 10.1007/s10526-012-9448-0.
- Jackson, M.A., M. McGuire, L.A. Lacey, and S. P. Wraight. 1997. Liquid Culture production of desiccation tolerant blastospores of bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycology. Res.* 10:35-41.
- López-Arroyo, J.I., Loera, J.G., Reyes, M.A.R., y M.A.P. Rocha. 2003. Estado actual de las plagas potenciales de los cítricos en México ¿Es la oportunidad para el uso de depredadores?, en Guadalajara, Jalisco, México. *Memorias del XIV Curso Nacional de Control Biológico*. Nov. 3 pp. 249-263.
- Pérez-González, O., Rodríguez, V.A.R., Rodríguez, G.R., López, A.I.J., Elias, S.M. y B.G.M. Maldonado, 2012. Caracterización de cepas de *Hirsutella* aisladas de *Diaphorina citri* Kuwayama de diferentes estados de México. 3° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los cítricos y el Huanglongbing en México, pp: 323,331.
- Prakash, G.V.S., Padjama, V. y R.R. Siva Kiran. 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 99 1530-1537.
- Rivero-Aragon, A. and H. Grillo-Ravelo. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. *Centro-Agrícola* 27:87-88.
- Subandiyah, S., N. Nikon, H. Sato, F. Wagiman, S. Tsuyumu and T. Fakatsu. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psilloidea) in Indonesia. *Mycoscience* 41:509-513