

# Efecto de la citrolina sobre la viabilidad y la producción de proteasas y quitinasas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Teresa Mier<sup>1</sup>, Berenice Rosas-López<sup>1</sup>  
Judith Castellanos-Moguel<sup>1</sup>, Karina García-Gutiérrez<sup>1</sup>, Conchita Toriello<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D.F. 04960, México,  
<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

## Effect of citroline in the viability and in the proteases and chitinases production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

**Abstract.** The effect of the mineral oil citroline (agrochemical, insecticide and conidial dispersant agent) in the viability, and in the proteases and chitinases production of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* was studied. Citroline showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) in fungal viability when compared to the control without citroline (81.4% reduction of colony forming units). Although citroline didn't show significant effect ( $p > 0.05$ ) in the fungal production of proteases and chitinases, the activities' halos were always reduced by the mineral oil, in 24.4 and 14.4%, respectively. The results suggest a negative effect on the viability of the fungus.

**Key words:** citroline, viability, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

**Resumen.** Se estudió el efecto del aceite mineral citrolina (agroquímico, insecticida y dispersante de conidios fúngicos) sobre la viabilidad y producción de proteasas y quitinasas de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la inhibición del crecimiento (81.4 % de reducción de unidades formadores de colonias) al compararlo con un testigo sin citrolina. Aunque no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la producción de proteasas y quitinasas entre hongo tratado y testigo, los halos de actividad enzimática disminuyeron 24.4 y 14.4%, respectivamente, en presencia de citrolina. Los resultados sugieren un efecto adverso en la viabilidad del hongo.

**Palabras clave:** citrolina, viabilidad, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Received: 4 noviembre 2004; aceptado 16 noviembre 2004.

Recibido: 4 November 2004; accepted 16 November 2004.

La citrolina o aceite mineral de verano (primaveral dormant spray) es un aceite parafínico destilado del petróleo, la fracción de aceite mineral es biodegradable, poco móvil en el suelo e insoluble en agua. La citrolina ha sido clasificada como insecticida de contacto. El producto es usado en zonas con climas fríos como agroquímico en frutales, principalmente como regulador y estimulador de la brotación de las yemas de vid y frambuesa [11, 16], en defoliación química en cultivos de manzano y durazno [1,7] y para el adelanto de la floración en ciruelo [6]. Además, se aplica

*Autor para correspondencia: Teresa Mier*  
*tmier@correo.xoc.uam.mx*

como plaguicida en el control del minador de la hoja de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*) [2], contra virus fitopatógenos como el de la mancha anular del papayo y del mosaico dorado del frijol [3].

Por otro lado, la citrolina también ha sido usada para la dispersión de conidios en formulaciones de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* [14] y *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (antes *M. flavoviride*) [8]. Este último hongo infecta la langosta, *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons* (Orthoptera: Acrididae), plaga devastadora de cultivos básicos y que fue detectada en 780,000 ha de diferentes estados de la República Mexicana

[15]. Esta especie de *Metarhizium* está siendo usada como agente microbiano en el control biológico de la langosta y el chapulín en Africa [10] y en Australia [9]. En México está siendo aplicada en campo [8] como una alternativa al uso de insecticidas químicos.

Debido a algunos efectos tóxicos reportados para la citrolina (<http://www.fer.es/luisbanares/pc/seguridad.htm>, 20/octubre/2004), y a su uso en formulaciones de conidios entomopatógenos [8, 14], en el presente trabajo se determinó su efecto *in vitro* sobre la viabilidad y producción de las enzimas proteasas y quitinasas de un cultivo monospórico, EH-502/8, derivado del cultivo original MaP140 de *M. anisopliae* var. *acridum*, aislado de la langosta en México, proveniente del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, SAGARPA, Colima.

El hongo se cultivó en medio de papa dextrosa agar (PDA) (Bioxón, México) y se incubó durante 12 días a 28°C. Se preparó una suspensión fúngica de 10<sup>7</sup> conidios/ml en citrolina, y un testigo sin citrolina, y se incubó durante 24 h a 4°C. Luego, se determinó la viabilidad de los conidios de acuerdo a las unidades formadoras de colonias (UFC), en cajas de Petri con medio PDA, sembradas con 200 µl de diferentes diluciones de la suspensión fúngica incubando las cajas durante siete días a 28°C. El porcentaje de inhibición de crecimiento se calculó con la fórmula descrita en Mier *et al.* [12] y los resultados se compararon con el testigo. Para la determinación de proteasas se sembraron 100 µl de la suspensión de 10<sup>7</sup> conidios/ml en fositas centrales de cajas con medio H (en g/l: dextrosa 5, sacarosa 10, extracto de levadura 5, peptona 0.5, agar 15) adicionado de 10 g/l de caseína (Sigma de México, México). Para la determinación de quitinasas, se sembró de igual manera que para las proteasas, solamente que en cajas con medio de sales (en g/l: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.375, MgSO<sub>4</sub> 0.275, agar 15) según Chul-Kang *et al.* [5], adicionado de 20 g/l de quitina coloidal [4]. Las cajas se incubaron durante 8 días a 28°C, se midió el diámetro de los halos de producción de las enzimas en los medios respectivos,

y los resultados se compararon con los testigos sin citrolina. Todos los experimentos se hicieron por triplicado con cuatro réplicas y se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de una vía [13].

Los ensayos fueron llevados a cabo con conidios con una viabilidad mayor a 96%. Después del tratamiento con citrolina se encontró un promedio de 207 UFC en comparación con 1114 UFC del testigo sin citrolina. Se observó inhibición de las UFC en un 81.4% en los conidios con citrolina, encontrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al compararla con el testigo. El diámetro promedio de los halos de proteasas en las cajas con citrolina fue de 29.0 mm en comparación con 38.4 mm del testigo; y para las quitinasas, de 21.4 mm en comparación con 25.0 mm del testigo. Los halos de actividad enzimática registraron una reducción del 24.4 y 14.4%, para proteasas y quitinasas respectivamente, cuando el hongo se trató con citrolina. Al comparar los resultados con el testigo sin citrolina no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la producción enzimática.

En este estudio se mostró un efecto inhibitorio de la citrolina sobre la viabilidad de *M. anisopliae* var. *acridum*. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la disminución de la producción enzimática, el porcentaje de reducción de los diámetros de los halos de actividad de ambas enzimas indican que bajo las condiciones del estudio la citrolina incide, de alguna manera, en estos procesos fisiológicos. Tomando en consideración que la citrolina está siendo usada como agroquímico en el país, que causa síntomas toxicológicos por inhalación, ingestión o por contacto directo (<http://www.fer.es/luisbanares/pc/seguridad.htm>, 20/oct./2004), y que se observó un efecto adverso en la viabilidad del hongo entomopatógeno estudiado, se sugiere realizar otras investigaciones sobre este agroquímico que puedan elucidar sus efectos sobre microorganismos presentes tanto en los agroecosistemas como en el suelo.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACyT (proyecto G-31451-B) el financiamiento para el desarrollo de este estudio.

## Literatura citada

1. Aroldo, I., F. Rumayor, 1988. La defoliación química en el cultivo de frutales caducifolios en climas semidesérticos y cálidos. *Revista de Fruticultura* 3: 335-336.
2. Bautista-Martínez, N., O. Morales, J.L. Carrillo-Sánchez, H. Bravo, 1998. Mortalidad de *Phyllocnistis citrella* con un aceite mineral y nim. *Manejo Integrado de Plagas* 50: 29-33.
3. Becerra, N., G. Fraire, E. López, 1996. Evaluación de aceites insecticidas para el control del virus del mosaico dorado (VMDF) del frijol en Chiapas, México. *Agronomía Mesoamericana* 7: 67-73.
4. Chávez-Camarillo, G., R. Cruz-Camarillo, 1984. El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 26: 203-215.
5. Chul-Kang, S., S. Park, D. Gyu-Lee, 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 276-281.
6. Delgado-Blancas, M.I., P. Cruz-Hernández, 1989. Efecto de la citrolina y citrolina más dinitro sobre el adelanto de floración de ciruelo japonés *Prunus salicina* L. cv. Methley en Tetela de Ocampo, Puebla. *Revista Chapingo* 13-16: 34-38.
7. Esparza-Frausto, G., J. Rodríguez Alcázar, A. E. Becerril-Román, 1993. Producción forzada de manzanos de bajo requerimiento de frío con defoliaciones químicas en verano. *Revista Fitotecnia Mexicana* 16: 179-189.

8. Hernández-Velázquez, V. M., D. M. Hunter, L. Barrientos-Lozano, R. Lezama-Gutiérrez, R. Reyes-Villanueva, 2003. Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes): laboratory and field trials. *Journal of Orthoptera Research* 12: 89-92.
9. Hunter, D. M., R. J. Milner, P. A. Spurgin, 2001. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Bulletin of Entomological Research* 91: 93-99.
10. Lomer, C. J., R. P. Bateman, D. L. Johnson, J. Langewald, M. Thomas, 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology* 46: 667-702.
11. Márquez-Cervantes, J.A., R. Cano-Medrano, J. Rodríguez-Alcázar, 2000. Thidiazuron, citrolina y unidades frío en el rompimiento de letargo de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 6: 105-110.
12. Mier, T., C. Silva-Romero, I. Méndez, M. Ulloa, C. Toriello, 1999. Effect of three insecticides used in Mexico on whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) and a fungicide on the viability and morphology *in vitro* of *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41: 217-222.
13. Montgomery, D. C., 2003. Diseño y análisis de experimentos. Limusa, México, D.F.
14. Olayo-Paredes, R. P., G. Gallegos-Morales, E. Guerrero-Rodríguez, V. M. Sánchez-Valdez, F. de J. Sánchez-Pérez, M. Cepeda-Siller, 2003. Evaluación de formulaciones de *Beauveria bassiana* (Vuill.) en campo sobre *Amphidees* spp. (Coleoptera: Curculionidae) en Arteaga, Coahuila. XXVI Congreso Nacional de Control Biológico. Guadalajara, Jalisco, México, noviembre 3-8, p. 257-260.
15. Ramírez-Sagahon, J. C., H. M. Sánchez-Anguiano, M. R. Rodríguez-Quiroz, 2001. Campaña contra la langosta en México. En: SAGARPA (Ed.), Memoria Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta. México City, pp. 9-15.
16. Rodríguez A., V. Almaguer, 1980. Effects of some chemicals on red raspberry bud break. *Acta Horticulturae* 1: 217-220.