

## EXPLORACION Y AISLAMIENTO DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS PARA EL MANEJO DE PLAGAS DE ZARZAMORA: UN ENFOQUE REGIONAL

Hipolito Cortez-Madrigal. Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Justo Sierra # 28, Col. Centro, Jiquilpan, Mich. México, CP. 59510. hcortezm@ipn.mx.

**RESUMEN:** Para obtener aislamientos de hongos entomopatógenos se desarrollaron muestreos durante cuatro meses del 2012 en cuatro regiones de Michoacán: Valle de Los Reyes, Los "Chorros del Varal" y San Rafael, Los Reyes y; San Miguel, Villamar. Se colectaron insectos vivos y micosados, hongos fitopatógenos, muestras de suelo y follaje. Se obtuvieron 69 aislamientos de tres géneros: *Lecanicillium* (44.9%), *Beauveria* (17.4%) y *Metarhizium* (37.7%). *Lecanicillium* se recuperó de insectos micosados en zonas naturales con microambiente húmedo; *Metarhizium* fue el más común en suelo; mientras que *Beauveria* se aisló de insectos vivos y muestras de suelo. El 36.5% de los aislamientos se obtuvo de zonas agrícolas y el 64.5% de zonas naturales; la proporción fue similar para zonas cálidas y frías (47.8%). Se concluye que la región de estudio presenta alto potencial como reservorio de hongos entomopatógenos, aspecto importante de considerar para el manejo regional de plagas.

Palabras clave: *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, Aislamientos, Michoacán.

### Exploration and isolation of entomopathogenic fungi: a regional approach for the blackberry pest management

**ABSTRACT:** To obtain isolates of entomopathogenic fungi for pest management sampling took place during four months of 2012 in four regions of Michoacan: Los Reyes Valley, "Los Chorros del Varal" and San Rafael, Los Reyes and; San Miguel, Villamar. Live and fungi infested insects, fungal phytopathogenic, soil and foliage samples were included. Three genus of the 69 fungal isolates were obtained: *Lecanicillium* (44.9 %), *Beauveria* (17.4 %) and *Metarhizium* (37.7%). *Lecanicillium* was recovered of sporulated cadavers in natural areas with moist microenvironment; *Metarhizium* was the most common in soil; while *Beauveria* was isolated from soil and live insects; 36.5% of the isolates were recovered from agricultural areas, and 64.5 % from natural areas; the proportion was similar for cold and warm climate (47.8 %). It is concluded that the study region has high potential as a reservoir of entomopathogenic fungi, important aspect to consider for the regional pest management.

Key words: *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, Isolates, Michoacán.

### Introducción

Los hongos son uno de los principales grupos de entomopatógenos utilizados en el manejo de insectos plaga a nivel mundial, lo que se debe básicamente a la facilidad para producirlos masivamente, su inocuidad al ambiente y a los animales de sangre caliente. Adicionalmente, los hongos son los únicos entomopatógenos que invaden al hospedero vía cutícula (De Faria y Wraight, 2007), aspecto de interés para el manejo de plagas con hábitos alimenticios tipo picador-chupador, tales como: áfidos, mosca blanca, trips, chicharritas y chinches; entre otros. Aunque existen productos comerciales basados en hongos, una desventaja de usar esas cepas de manera generalizada, es que en muchos casos no se especifican sus características básicas, aspecto fundamental en la selección de micoinsecticidas y su manejo en campo. Una primera recomendación es primero explorar cepas regionales, presumiblemente más adaptadas a las condiciones locales (Soper y Ward, 1980). Aunque se han mencionado diversas metodologías para la exploración y aislamiento de hongos entomopatógenos (Goettel e Inglis, 1997; Lacey y Brooks, 1997) dichas estrategias han sido poco explotadas. Ampliar e implementar nuevas estrategias de búsqueda y aislamiento de hongos, eventualmente redituará en una mayor riqueza de

especies y cepas y consecuentemente en mayores probabilidades de seleccionar cepas más promisorias para el manejo regional de plagas. El objetivo del estudio fue explorar y aislar mediante diversas metodologías, hongos entomopatógenos de la región de Los Reyes, Michoacán, con potencial para el manejo regional de plagas de zarzamora.

## Materiales y Método

**Regiones de estudio.** Se seleccionaron cuatro regiones: Valle de Los Reyes (plantaciones de zarzamora); área protegida “Los Chorros del Varal”, San Rafael; del Municipio de Los Reyes y; San Miguel, municipio de Villamar. Las regiones incluyen diferentes climas y grados de perturbación.

**Muestreos.** El estudio transcurrió durante enero y octubre-diciembre del 2012. En el Valle de Los Reyes los muestreos incluyeron plantaciones de zarzamora con diferente manejo: macro túnel, cielo abierto, orgánico y convencional. Se incluyeron plantas silvestres como *Asclepias curassavica*, zarzamora, vid y diversas especies de maleza. Las muestras fueron de insectos vivos y muertos y se dio énfasis a insectos del Orden Hemiptera (áfidos, mosca blanca, trips y chicharritas). Se incluyeron también muestras de suelo (tres por sitio) y tejido vegetal. Para mayores probabilidades de éxito, en los muestreos de insectos se consideró el microclima, de manera que se enfocaron a plantas cercanas a fuentes de agua y en el interior de hojas dañadas por áfidos (corrugadas). Las muestras de insectos vivos y de suelo se colectaron por separado en bolsas de plástico, mientras que los insectos muertos se colocaron en viales con silica gel. Las muestras se depositaron en una hielera donde se transportaron al laboratorio de entomología del CIIDIR-IPN en Jiquilpan, Michoacán.

**Aislamiento de hongos.** Las muestras de suelo se humedecieron y depositaron dentro de cajas Petri (7-10) e inmediatamente se colocaron tres larvas de *Galleria mellonella* por caja y se incubaron por 10 días a 25 °C. Los insectos colectados vivos se colocaron en cajas Petri con un círculo de papel filtro (Whatman # 1) humedecido para favorecer las condiciones de desarrollo del hongo. Los insectos de ambas pruebas que resultaron muertos se colocaron en cámara húmeda para el desarrollo del hongo.

Para insectos micosados en campo, mediante un estereoscopio y una micro aguja se obtuvieron muestras de micelio y fructificaciones y se transfirieron a cajas Petri con medio agar dextrosa de sabouraud (ADS). Un procedimiento similar fue utilizado para los hongos entomopatógenos aislados de roya (Uredinales). Todo se hizo en una campana de flujo laminar. Para el tejido vegetal, trozos de 7-10 mm de tallo (zarzamora y malezas) se desinfectaron con cloro 8% sumergiéndolos durante 3 s, se dejaron secar, se cortaron por mitad y se colocaron en cajas Petri con medio ADS. Se incubaron hasta la aparición del desarrollo fúngico. Una vez purificados, los hongos se transfirieron a tubos de ensaye con medio ADS y se rotularon con los datos correspondientes. Los aislamientos se denominaron mediante una clave que indica el género del hongo, el hospedero, la región de colecta y el número de aislamiento. Se conservan a  $25 \pm 1$  °C y son renovados periódicamente.

## Resultados y Discusión

Se obtuvieron 69 aislamientos de hongos entomopatógenos distribuidos en tres géneros: *Lecanicillium* (prob. *lecanii*), *Metarhizium* (prob. *anisopliae*) y *Beauveria* sp. (prob. *bassiana*), con porcentajes relativos de 44.9%, 37.7% y 17.4%, respectivamente (Fig. 1A). Resulta interesante resaltar que de las regiones muestreadas, el 36.5% de los aislamientos se obtuvieron de áreas agrícolas (perturbadas), mientras que el 63.5% de áreas consideradas “naturales” (San Rafael y Chorros del Varal; Fig. 1B). La distribución de los aislamientos por tipo de clima muestra que fue similar entre clima templado y frío (Fig. 1C). Sin embargo, el género *Lecanicillium* que fue el más abundante, se

registró en mayor número, de aislamientos y diversidad de hospederos en la región fría que corresponde a San Rafael (Fig. 2 A).

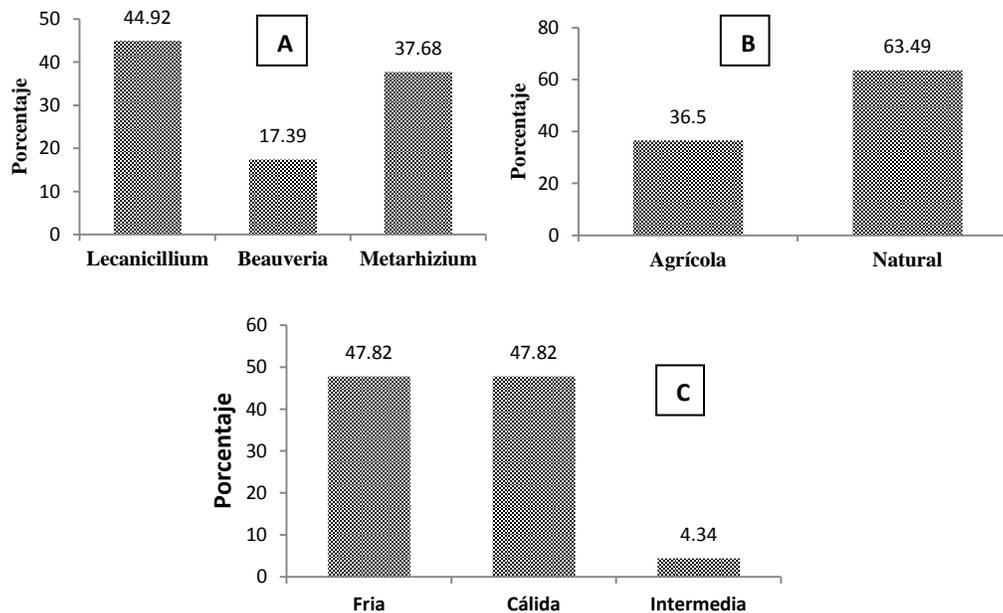


Figura 1. Porcentaje relativo de hongos entomopatógenos aislados de diferentes regiones de Michoacán con influencia de producción de zarzamora. A) Por géneros; B) Por grado de perturbación de la zona; C) Por clima. Oct.-dic. 2012.

De las cuatro regiones muestreadas, el mayor número de aislamientos correspondió a San Rafael, seguida del Valle y Los Chorros del Varal. Mientras que los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* fueron registrados en áreas agrícolas y naturales, *Lecanicillium* solo se registró en áreas naturales. Con excepción de Los Chorros del Varal, *Metarhizium* fue registrado en todas las regiones muestreadas, donde destacó el Valle Agrícola de Los Reyes. El género *Beauveria* fue el que se obtuvo en menor número (12) y a diferencia de *Metarhizium*, *Beauveria* se aisló de insectos vivos, micosados en laboratorio. Se aisló de Los Chorros del Varal, del Valle de Los Reyes y de San Rafael (Fig. 2A).

Los del género *Lecanicillium* fueron los únicos aislamientos obtenidos de insectos micosados en campo; se obtuvo de adultos de mosca blanca (9), áfidos (17), chicharritas (4) y roya de maleza (1) pero nunca de muestras de suelo. *Metarhizium* se aisló solo de muestras de suelo; mientras que *Beauveria*, además de registrarse en suelo, se obtuvo también de *Aphis nerii* en *A. curassavica* y de trips en zarzamora cultivada; en ambos casos, los insectos fueron colectados vivos y la micosis apareció en laboratorio. Adicionalmente esos insectos micosados se colectaron de plantas silvestres, incluida zarzamora y malezas de la familia Compositae (Fig. 2 B). Algo de resaltar fue que los aislados de *Lecanicillium* se obtuvieron de plantas cercanas a fuentes de agua y de hojas de malezas dañadas por áfidos (corrugadas) con áfidos micosados en su interior. Es de suponer que ese microambiente fue favorable para el desarrollo del entomopatógeno.

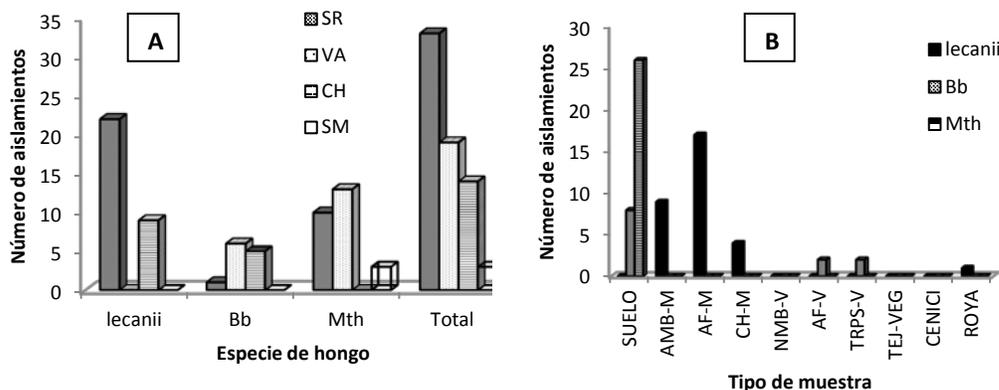


Figura 2. Distribución de aislamientos de especies de hongos entomopatógenos con influencia de producción de zarzamora. Por región (A) y por tipo de muestra (B). *Lecanii* = *Lecanicillium*; Bb=*Beauveria*; Mth=*Metarhizium*, SR= San Rafael; VA=Valle de los Reyes; CH=Chorros del Varal; SM=San Miguel. AMB-M=Adultos de mosca blanca muertos; AF-M= Afidos muertos; CH-M= Chicharritas muertas; NMB-V=Ninfas de mosca blanca vivas; AF-V=Afidos vivos; TRPS-V=trips vivos; TEJ-VEG=Tejido vegetal; CENICI=Cenicilla. Oct.-dic. del 2012.

Lo anterior indica la importancia que juegan las áreas naturales en la conservación de enemigos naturales de plagas, incluidos los hongos entomopatógenos, lo que corrobora la hipótesis inicial del proyecto en el sentido de considerar la vegetación silvestre y el micro hábitat de los insectos en las exploraciones de hongos entomopatógenos. De no haber seguido esa metodología no se hubiese registrado a *L. lecanii*, pues se sabe que ese hongo demanda alta humedad relativa para su desarrollo (Hall, 1981). Cortez Madrigal *et al.* (2013) registraron también mayores epizootias del hongo *Hirsutella citriformis* en poblaciones de *Diaphorina citri* en áreas de baja perturbación ecológica y microclimas favorables en la península de Yucatán; incluyó huertos de traspatio y la planta ornamental *Murraya paniculata*.

Durante el estudio no se registraron insectos micosados con *Metarhizium* o *Beauveria* en campo. Aun cuando la literatura señala que *L. lecanii* puede parasitar hongos fitopatógenos como royas y cenicillas (Hall, 1981), solo de las primeras se obtuvieron aislamientos del hongo *Lecanicillium*. De igual manera, aunque se ha mencionado que los hongos entomopatógenos pueden actuar como organismos endofíticos (Ownley *et al.*, 2010), de las muestras de tejido vegetal analizadas no se lograron obtener aislamientos de hongos entomopatógenos (Fig. 2B). Un análisis preliminar de la diversidad de aislamientos en cuanto a morfología, tamaño y producción de esporas, entre otros, demuestra una amplia diversidad aislamientos en la región de estudio lo que sugiere la importancia de utilizar metodologías similares a la aquí empleada en la exploración de nuevas cepas de hongos entomopatógenos.

Los resultados del presente proyecto sugieren que la región de estudio presenta una gran riqueza en cuanto a diversidad de hongos entomopatógenos, pues se obtuvieron aislamientos de clima frío (1900 msnm), clima cálido (< 1000 msnm) y clima intermedio (1500 msnm), aspecto importante de considerar para el manejo de plagas regionales, en este caso de la zarzamora.

**Agradecimientos**

A la coordinadora nacional de Fundaciones Produce (COFUPRO) por el financiamiento otorgado y a los productores de la agrupación PROCAL, de Los Reyes Michoacán por el apoyo brindado durante los muestreos.

**Literatura Citada**

- Cortez-Madrigal, H., G. Mora-Aguilera and R. A. Humber. 2013. Exploración y aislamiento de hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* en la Península de Yucatán. Pp. 93-105. *In*: Mendoza P., J. de D., E. De la Cruz L., E. Martínez M., R. Osorio O., and M. A. Estrada B., (eds.). Tópicos Selectos de Agronomía Tropical. Vol. 2. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tab. México.
- De Faria, M. R., S. P., Wraight. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types *Biological Control* 43:237–256.
- Goettel, M. S. y G. D. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. PP. 213-249. *In*: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press. Wapato, WA. USA.
- Hall, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. *In*: *Microbial control of pests and plants disease*. H.D. Burges (edit.). Academic Press, N.Y. pp. 483-498.
- Lacey L. A y Brooks, W.M. 1997. Inicial handling and diagnosis of diseased insects. Pp. 1-15. *In*: Lacey, L.A. (ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press. Wapato, WA. USA.
- Ownley, B. H., K. D. Gwinn y F. E. Vega. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55:113–128.
- Soper, R. S. y M. G. Ward. 1980. Production, formulation and application of fungi for insect control. *In*: G.C. Papavizas (Ed.). *Biological control in crop production*. Allamheld, Osmun, Totowa. Pp. 161-180.