

AISLAMIENTOS DE *Metarhizium* spp. Sorokīn, 1879 PRESENTES EN LA ZONA SUR DE TAMAULIPAS, MÉXICO

Julieta Azucena Hernández-Mejía¹, Reyna Ivonne Torres-Acosta², Pedro Almaguer-Sierra, Othón J. González-Gaona¹, Ludivina Barrientos-Lozano¹✉

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria-División de Estudios de Posgrado e Investigación. Boulevard Emilio Portes Gil N°.1301, C. P. 87010. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

²Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante. Blvd. Enrique Cárdenas González N°.1201 Pte. Col. Jardín C. P. 89840. Cd. Mante, Tamaulipas, México.

✉ Autor de correspondencia: ludivinab@yahoo.com

RESUMEN. *Metarhizium* spp., es un género ampliamente utilizado en control biológico de plagas. Por lo que es importante aislar e identificar cepas locales que permitan estudiar su potencial en el manejo de plagas regionales. En este trabajo se buscaron aislamientos de *Metarhizium* spp., en la zona sur de Tamaulipas, México. Se recolectaron muestras de suelo en cultivos de soya en los municipios de Bustamante, Xicoténcatl, Mante, Ocampo, Tula y Gómez Farías. Para muestrear se utilizó el método “cinco de oros”, recolectándose cinco bolsas de suelo por municipio, éstas se transportaron al laboratorio y se procesaron aplicando la técnica “insecto-trampa”, utilizando larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758). Las larvas que desarrollaron micosis se procesaron y se aislaron los hongos entomopatógenos. Posteriormente éstos se sembraron en Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Para identificar las colonias se consideraron características de forma y estructuras de crecimiento, color y tamaño de las conidias. Se obtuvieron dos aislamientos de *Metarhizium* spp., uno en muestras de Xicoténcatl y otro en las de Bustamante. Éstos se reprodujeron en arroz como sustrato y se obtuvo una concentración de 1×10^8 conidias/mL para cada aislamiento. En ensayos de laboratorio se utilizaron grillos [*Acheta domesticus* (Linnaeus, 1758)], en los que se obtuvo 77 % de patogenicidad para el aislamiento de Xicoténcatl y 68 % para el de Bustamante.

Palabras clave: Tamaulipas, hongos entomopatógenos, bioensayos, manejo de plagas

Strains of *Metarhizium* spp., Sorokīn, 1879 in southern Tamaulipas, México

ABSTRACT. *Metarhizium* spp., is widely used in biological control of insect pests. Therefore, it is important to isolate and identify local strains that allow studying their potential in regional pest management. This work aimed to find local strains of *Metarhizium* spp., in southern Tamaulipas, Mexico. Soil samples were collected in soybean crops in the municipalities of Bustamante, Xicoténcatl, Mante, Ocampo, Tula, and Gómez Farías. A “five diamond pattern” was followed for sampling, collecting five bags of soil (500 g each) per municipality. Soil samples were transported to the laboratory and processed using the “insect-trap” technique, for which *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) larvae were used. Larvae that developed mycosis were processed and entomopathogenic fungi were isolated. Subsequently, fungi were grown in Potato Dextrose Agar (PDA) as culture medium. Identification of colonies was performed taking into account their characteristics of shape and growth structures, color, and size of the conidia. Two isolates of *Metarhizium* spp., were obtained in samples from the municipalities of Xicoténcatl and Bustamante, a strain from each municipality. Isolates were increased using rice as substrate, a concentration of 1×10^8 conidia/mL per isolate was obtained. In laboratory trials, we used crickets [*Acheta domesticus* (Linnaeus, 1758)], the isolate from Xicoténcatl provided 77 % pathogenicity vs, 68 % for the strain from Bustamante.

Keywords: Tamaulipas, entomopathogenic fungi, bioassays, pest management.

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos están representados por más de 750 especies con gran potencial como controladores de plagas (Motta *et al.*, 2011). En los últimos años su uso se ha incrementado como alternativa a los plaguicidas químicos, ya que algunos son fáciles de manipular, reproducir, formular y son inofensivos para el ambiente, el ser humano y especies de invertebrados no blanco

(France *et al.*, 2016). En México hay numerosos ejemplos del uso exitoso de hongos entomopatógenos en el manejo de plagas en los sectores agrícola, pecuario y forestal (Pacheco-Hernández *et al.*, 2019); trabajo en el que ha desempeñado un papel fundamental El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) (Trevor *et al.*, 2013; Pacheco-Hernández *et al.*, 2019). Sin embargo, es necesario fortalecer el conocimiento sobre la diversidad y taxonomía de especies de hongos entomopatógenos de diversos géneros, lo cual se puede lograr mediante exploraciones en campo en diferentes localidades de la república (Pérez *et al.*, 2017). El uso de entomopatógenos es una de las estrategias más aplicadas contra distintas plagas insectiles, esto se debe a su gran efectividad y baja toxicidad contra mamíferos, lo que los ha convertido en organismos de interés como bioplaguicidas (Hruska, 2019). Distintos hongos entomopatógenos, entre ellos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, tienen reportes de su eficacia en el control y reducción de poblaciones de insectos plaga (Ullah *et al.*, 2019). En el género *Metarhizium* se pueden encontrar especies tanto generalistas que atacan más de siete órdenes de insectos hasta especialistas que sólo infectan ciertas familias (Aw y Hue, 2017). Estudios de campo y laboratorio han mostrado su eficacia y capacidad para el control de plagas agrícolas y forestales (Sun *et al.*, 2011). La obtención de cepas de *Metarhizium*, y otros hongos entomopatógenos, se puede hacer mediante recolecta y procesamiento de muestras de suelo, recolecta en campo de insectos infectados, e incluso de colecciones de hongos entomopatógenos (Obando *et al.*, 2013). Para evaluar la virulencia de diferentes aislamientos de un mismo género, es importante tomar en cuenta la concentración (dosis) a aplicar, así como las condiciones en las que se realiza el experimento; ya que estos factores influyen en la capacidad de adherencia y penetración al insecto, en la producción de toxinas y en la susceptibilidad del insecto a la infección. Por lo que es importante el detectar los aislamientos más patogénicos mediante pruebas de virulencia y patogenicidad (Valencia *et al.* 2011). Este trabajo tuvo como objetivo la búsqueda, aislamiento, reproducción y evaluación mediante bioensayos, de aislamientos de *Metarhizium* spp., en la región sur de Tamaulipas. Lo cual permitirá a mediano o largo plazo su uso en el manejo de plagas en la región.

MATERIALES Y MÉTODO

El presente trabajo se realizó en el Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria y en la Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT).

Búsqueda: se recolectaron cinco muestras de suelo (500 g cada una) por municipio, en cultivo de soya, en el sur de Tamaulipas. El material se recolectó en Bustamante, Xicotécatl, Mante, Ocampo, Tula y Gómez Farías mediante el método “cinco deoros”. Las muestras se transportaron al laboratorio donde se tamizaron y 300 g de cada una se colocaron individualmente en recipientes de plástico de medio litro; enseguida se asperjaron con agua corriente para incrementar el contenido de humedad y propiciar el desarrollo de hongos patógenos. Para determinar la presencia de hongos se utilizó la técnica “insecto-trampa”, colocando diez larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (gusano de harina) por recipiente. Las muestras se revisaron diariamente, durante cinco días. Se obtuvieron larvas infectadas de muestras de dos municipios, éstas se colocaron en hipoclorito de sodio al 0.5 % durante cinco minutos, posteriormente se lavaron cuatro a cinco veces con agua destilada y se colocaron en cámara húmeda en cajas de Petri esterilizadas, incubándose a temperatura ambiente durante una semana.

Aislamiento: de las larvas que desarrollaron micosis se obtuvo directamente por medio de un asa una pequeña muestra del hongo, el cual se sembró en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA).

Reproducción: primeramente, se preparó un medio líquido (750 mL de agua destilada, 20 g de levadura y 20 g de azúcar), al que se le agregaron uno a dos cuadros de 1 cm² cada uno aproximadamente de agar en el que previamente se había sembrado el patógeno. Éste se dejó en agitación durante tres días a una velocidad de 150 RPM. Finalmente se observó el crecimiento de micelio en la parte superior de los matraces. Estos cultivos de los patógenos se utilizaron para reproducirlos usando arroz como sustrato. Para lo cual una bolsa de arroz comercial (900 g) se repartió en cuatro porciones de 225 g aproximadamente cada una. El arroz pasó por un proceso de desinfección y esterilización antes de ser inoculado. Cada una de las cuatro muestras de arroz por aislamiento, se inoculó con 20 mL del patógeno en el medio líquido. Doce a 15 días después se logró observar un cambio en la coloración del arroz y éste se volvió poroso debido a la esporulación del hongo en los granos.

Bioensayos en laboratorio: se preparó una solución de Tween 80 al 0.1 %, tomando 4 mL de Tween 80 comercial que se agregaron a 400 mL de agua destilada; enseguida, esta solución se repartió en cuatro porciones de 100 mL cada una. A cada porción/muestra se le agregaron \pm 10 g de arroz en el que previamente creció el hongo. Posteriormente se tomó un tubo Eppendorf® al cual se le agregaron 900 μ L de agua destilada y 100 μ L de solución preparada con el hongo. De cada tubo se tomaron 20 μ L y se colocaron en la cámara de Neubauer para contar el número de conidias. Para los bioensayos se usaron ninfas y adultos jóvenes de *Acheta domesticus* (Linnaeus, 1758), adquiridos de un proveedor nacional. Se probaron preliminarmente dos aislamientos encontrados, más Tween 80 y agua destilada como control, teniendo así cuatro tratamientos con 10 réplicas cada uno y 10 grillos por réplica. Los insectos se asperjaron con una solución de conidias en agua destilada a una concentración de 1×10^8 conidias/mL (Figura1) y se mantuvieron a 27 ± 1 °C. Las cajas de Petri se revisaron diariamente durante cinco días para obtener el porcentaje de mortalidad. Se estableció un modelo completamente al azar, los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y las medias se compararon mediante una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

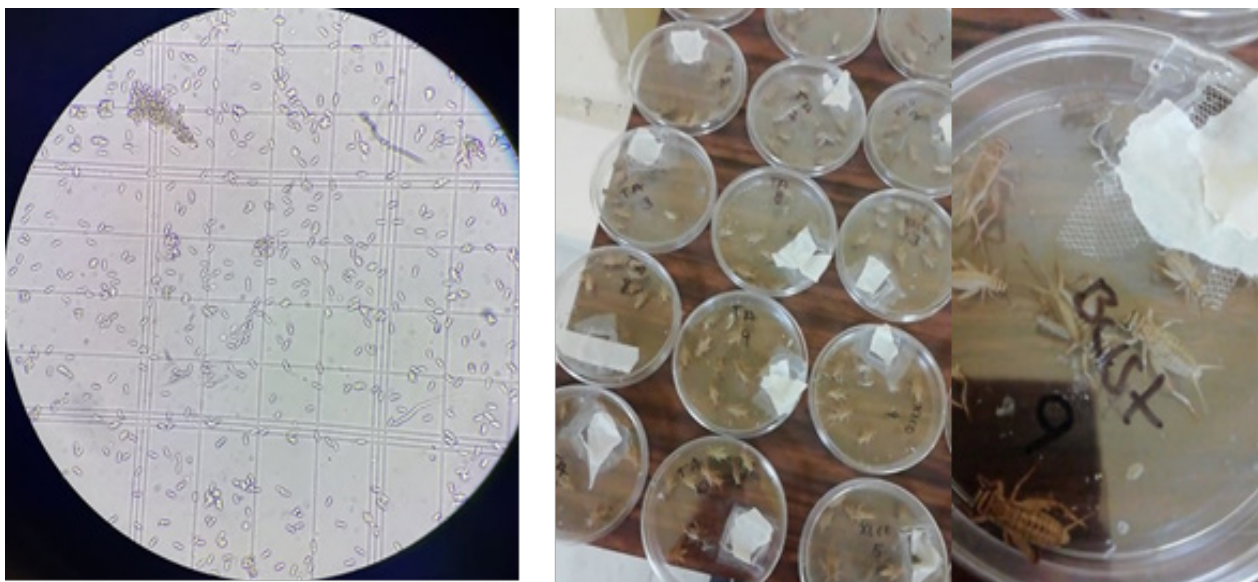


Figura 1. a) Esporas de *Metarhizium* sp., vistas al microscopio en cámara de Neubauer (40x);
b) cajas Petri con grillos (*Acheta domesticus*) en observación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 30 muestras de suelo recolectadas en seis municipios (cinco muestras por localidad) en el sur de Tamaulipas se obtuvieron dos aislamientos del género *Metarhizium* spp., uno en muestras del municipio de Xicoténcatl y otro en las de Bustamante. Las colonias se identificaron considerando características de forma y estructuras de crecimiento, color y tamaño de las conidias. Las larvas de *T. molitor* utilizadas como cebo son susceptibles a infectarse con los hongos entomopatógenos. La técnica de insecto-trampa es ampliamente utilizada para la detección de hongos entomopatógenos, p. ej., Obando *et al.* (2013) usaron larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1756 para obtener aislamientos de *M. anisopliae* en muestras de suelo recolectadas en cultivo de caña de azúcar. En los primeros dos días, en este experimento, los insectos mostraron una disminución en su actividad; lo que puede estar relacionado con la capacidad de las esporas de adherirse y penetrar el tegumento del insecto (Valencia *et al.*, 2011). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P = \leq 0.0001$); el aislamiento de Xicoténcatl (T1) proporcionó el mayor porcentaje de mortalidad (77 %), seguido por el de Bustamante (68 %), la Figura 2 muestra los porcentajes de mortalidad acumulados en cinco días que duró el experimento. Estos porcentajes de mortalidad son más altos que los obtenidos por Ramírez *et al.* (2019) al evaluar la mortalidad de aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre ninfas del hemíptero *Dactylopius opuntiae* Cockerell en un periodo de 192 h, el porcentaje más alto de mortalidad (41.3 %) se obtuvo con *M. anisopliae*.

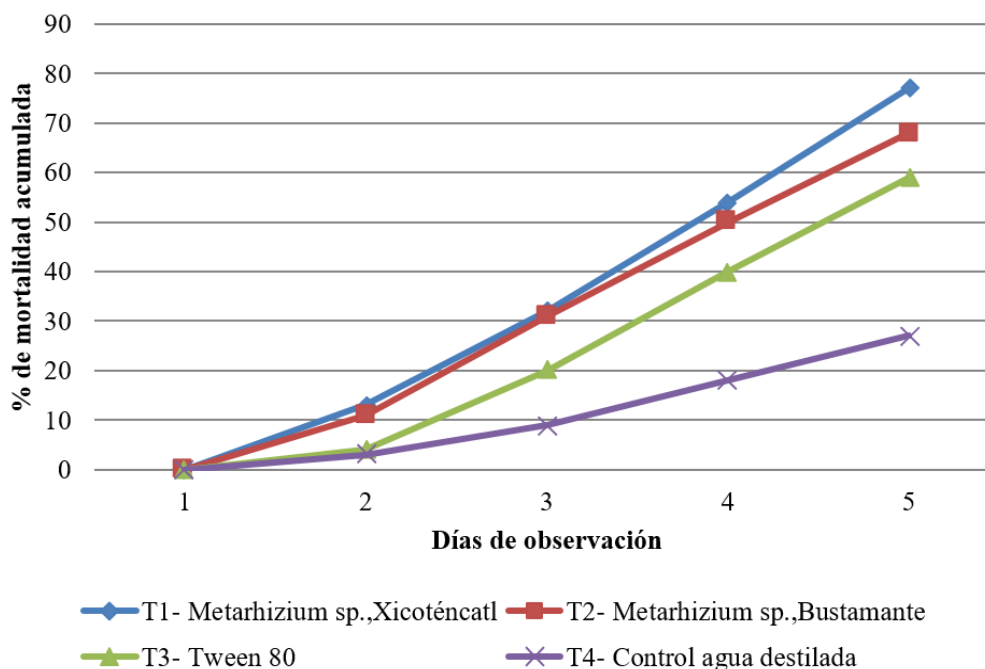


Figura 2. Mortalidad acumulada (%) en cada uno de los cuatro tratamientos para evaluar patogenicidad de *Metarhizium* spp., sobre *Acheta domesticus*.

Los dos aislamientos de *Metarhizium* spp., probados proporcionaron buen porcentaje de mortalidad acumulada (77 % Xicoténcatl y 68 % Bustamante), por lo que tienen potencial para continuar estudios adicionales y realizar ensayos con especies plaga regionales. Trabajos previos sobre larvas del coleóptero *Ancognatha scarabaeiodes* (Erickson, 1847) usando *M. anisopliae*, misma concentración que se utilizó en este trabajo, reportan solo 46 % de mortalidad (Lucero *et al.*, 2004). No obstante,

la actividad biológica de hongos entomopatógenos es variable, p. ej., aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* evaluados bajo condiciones de laboratorio contra adultos de la mosca de la fruta [*Anastrepha obliqua* (Macquart)] en Chiapas, proporcionaron altos porcentajes de mortalidad 4-5 días después de la inoculación: Bb₂₆ y Bb_{JLSV} mataron el 99.8 y 93.5 % de la población, respectivamente; mientras que Ma_{CENGICAÑA} proporcionó el 89.8 % de mortalidad (Hernández Díaz-Ordaz *et al.*, 2010). De aquí la importancia de buscar y evaluar entomopatógenos locales para el control biológico de plagas regionales. En el Cuadro 1 se muestra la mortalidad corregida que permite separar de la mortalidad observada el efecto de mortalidad natural del tratamiento testigo (Abbott, 1925).

Cuadro 1. Datos de mortalidad y mortalidad corregida de aislamientos de *Metarhizium* spp., sobre ninfas y adultos de *Acheta domesticus* bajo condiciones de laboratorio. Los porcentajes de mortalidad variaron significativamente entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Tratamiento	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida con la Fórmula de Abbott (%)
T1- <i>Metarhizium</i> sp., Xicoténcatl	77	68.49
T2- <i>Metarhizium</i> sp., Bustamante	68	56.16
T3- Control Tween 80	59	19.17
T4- Control agua destilada	27	

CONCLUSIONES

Se presentan ensayos preliminares con dos aislamientos de *Metarhizium* spp., recolectados en el sur de Tamaulipas; ambos fueron patogénicos y muestran buen potencial para evaluar su actividad contra plagas regionales.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca N°. 722084 otorgada a JAHM para realizar estudios de Maestría. Al Tecnológico Nacional de México Campus Ciudad Victoria y a la Unidad Académica Multidisciplinaria Mante–Universidad Autónoma de Tamaulipas, por permitir el uso de equipo e instalaciones para llevar a cabo el presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. 1925. A Method of Computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, Vol.18 (2): 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Aw, K. M. S., Hue, S. M. 2017. Mode of infection of *Metarhizium* spp., fungus and their potential as biological control agents. *Journal of Fungi*, 3(2): 30-50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715920/pdf/jof-03-00030.pdf>
- France, A., Cisternas, E. y Urtubia, I. 2016. Hongos entomopatógenos: microorganismos benéficos para el control de *A. nodipennis*. *Informativo INIA La Cruz* 34: 1-2. Instituto de Investigaciones Agropecuarias: Centro Regional de Investigación La Cruz- Ministerio de Agricultura. Región Valparaíso, Chile. <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR40445.pdf>
- Hernández Díaz-Ordaz, N., Pérez, N. y Toledo, J. 2010. Patogenicidad de tres cepas de hongos

- entomopatógenos a adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) en Condiciones de Laboratorio. *Acta Zoológica Mexicana*. (n. s.), 26(3): 481-494. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372010000300001
- Hruska, A. J. 2019. Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) management by small holders. CABI: Center for Agricultural Bioscience International. www.cabi.org/cabreviews; fecha de consulta: 11-II-2020.
- Lucero Mafla, A.M., Peña Villamil, L.A. y Bacca Ibarra, T. 2004. Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Corpoica*, 15(1): 43-48. <http://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/23/25> Fecha de acceso: 15-II-2020.
- Motta Delgado, P.A., Murcia Ordoñez, B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2): 78-90. DOI:10.4136/ambi-agua.187. <https://www.redalyc.org/pdf/928/92819767006.pdf>
- Obando, J.A., Bustillo, A.E., Castro, U., y Mesa, N.C. 2013. Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1): 26-33. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v39n1/v39n1a05.pdf>
- Pacheco Hernández, M.L., Reséndiz Martínez, J.F. y Arriola Padilla, V.J. 2019. Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, Vol. 10 (56): 1-29. DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496> <https://cienciasforestales.inifap.gob.mx/index.php/ejemplares>
- Pérez Villamares, J.C., Burrola Aguilar, C., Aguilar Miguel, X., Sanjuan, T., Jiménez Sánchez, E. 2017. Nuevos registros de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* s. l. (Ascomycota: Hypocreales) del Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88(4): 773-783. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.013>. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1870-34532017000400773>
- Ramírez Sánchez, C.J., Morales Flores, F.J., Alatorre Rosas, R., Mena Covarrubias, J., Méndez Gallegos, S.D.J. 2019. Efectividad de hongos entomopatógenos sobre la mortalidad de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Publicación Especial* (22): 1-14. <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/1854/2049>
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Liu, Z., Ma, M., Gou, H., Chen, Z., Li, Y., Liu, A., Niu, Q., Yang, J., Yin, H., Luo, J. 2011. Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 180(3-4): 389-393. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.027>
- Trevor, W., Arredondo Bernal, H.C., Rodríguez del Bosque, L.A. 2013. Biological pest control in Mexico. *Annual Review of Entomology*, 58:119-40. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153552. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-ento-120811-153552>
- Ullah, M.I., Altaf, N., Afzal, M., Arshad, M., Mehmood, N., Riaz, M., Majeed, S., Ali, S., Abdullah, A. 2019. Effects of entomopathogenic fungi on the biology of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its reduviid predator, *Rhynocoris marginatus* (Heteroptera: Reduviidae). *International Journal of Insect Science*, 11: 1-7. doi: 10.1177/1179543319867116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6669838/>
- Valencia Cortés, C., Pérez, S.M., Aldana de la Torre, R., Mesa, E. y Gomes de Olivera, H. 2011. Patogenicidad de hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* sobre larvas de *Strategus aloeus* L. (Coleoptera: Scarabaeidae), en condiciones de laboratorio. *PALMAS*, 32(4): 30-40. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/10780/10771>