

DIVERSIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS DE SUELO DE AGROECOSISTEMAS DE MAÍZ EN EL ESTADO DE NAYARIT

Orlando Estrada-Virgen¹, Jhonathan Cambero-Campos^{1, 2}, Ndahita de Dios-Ávila², Claudio Rios-Velasco³, Carlos Rubén Carvajal-Cazola² y Agustín Robles-Bermúdez^{1, 2}. ¹Posgrado en Ciencias Biológicas Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela Km 9. ²Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México, carretera Tepic-Compostela Km 9. C.P. 63155 Tel: (311) 2111163. ³Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Cuauhtémoc, Chihuahua, México, C.P. 31570. maesvi_02@hotmail.com¹; jhony695@gmail.com²; ndahitadedios@gmail.com³; claudio.rios@ciad.mx⁴; carvajalcac@gmail.com⁵; nitsugarobles@hotmail.com⁶.

RESUMEN: Se recolectaron muestras de suelo de parcelas con cultivo de maíz, en localidades de Nayarit en el 2012. Las muestras fueron procesadas para el aislamiento de hongos entomopatógenos, el aislamiento de estos se realizó mediante la técnica de insecto trampa, usando a *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). Se obtuvieron cuatro aislados de seis localidades, de los cuales dos corresponden a *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii* (1) y *Beauveria bassiana* (1).

Palabras clave: Entomopatógeno, Maíz, Control Biológico.

Diversity of fungi isolated from soil entomopathogenic agroecosystems corn in the State of Nayarit

ABSTRACT: Soil samples from plots associated with the cultivation of maize in locations of Nayarit in 2012 were collected. To isolate of entomopathogenic fungi soil samples were processed, the isolation of these was performed by the technique of insect trap, using *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). Four isolation of six locations, which two correspond to *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii* (1) and *Beauveria bassiana* (1), were obtained. The isolated entomopathogenic fungi could be used in biological control programs of pest for increase in maize with emphasis in *Spodoptera frugiperda*.

Key words: Entomopathogenic, Corn, Biological Control.

Introducción

El cultivo de maíz (*Zea mays* L.) es afectado en todas sus etapas de desarrollo y producción por una gran diversidad de problemas fitosanitarios (Andrews, 1989), reportándose como plagas potenciales y con una amplia distribución geográfica, a los insectos “gallinas ciegas” *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Melolonthidae) y el “gusano cogollero” *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) conocido como (Casmuz *et al.*, 2010; Morón y Rodríguez del Bosque 2010).

La importancia de estas plagas radica en los daños causados al maíz en todas las etapas de desarrollo iniciales, particularmente en la de formación de raíces y cogollos, lo cual provoca pérdidas importantes en el cultivo (Del Rincón *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2011). Hernández *et al.* (2008); García y Bahena (2010) mencionan que estos daños se reflejan en una reducción en la acumulación de biomasa y granos en cultivos infestados, así como la pérdida completa de las plántulas en casos muy severos.

El uso de control microbiano especialmente con hongos entomopatógenos es una alternativa potencial, con ventajas frente a los insecticidas químicos, ya que su espectro de acción biológica es menor, no tiene efectos sobre los insectos benéficos o no blanco, además su producción es posible

sobre sustratos económicos y su aplicación en campo no altera el ambiente (Hamm, 1984). Por lo que, es una estrategia ecológica y económicamente viable para control de plagas, sustentado por su virulencia, movilidad, persistencia, especificidad, entre otros (Villalobos, 1992).

Los hongos entomopatógenos presentan un amplio espectro de hospederos (De Faria y Wraight, 2007), por estas razones es importante recolectar, purificar y conservar el germoplasma de la mayor variedad de sitios y especies. Al igual que con otros organismos, la conservación de cepas en colecciones de referencia deben ser prioritarios, ya que algunos genotipos pudieran perderse debido a cambios ambientales locales (Hernández *et al.*, 2011).

Debido a que en el estado de Nayarit se conoce poco sobre la diversidad y abundancia de hongos entomopatógenos en suelos agrícolas. Los objetivos fueron aislar e identificar hongos entomopatógenos en suelos cultivados con maíz en el estado de Nayarit, México.

Materiales y Método

Recolección de muestras de suelo. Se realizaron recolectas de suelo en áreas predeterminadas y con antecedentes que fueron cultivadas con maíz en el ciclo anterior en seis localidades del estado de Nayarit (Cuadro 1). Los sitios muestreados fueron ubicados con geoposicionador satelital (Garmin etrex) con los siguientes datos: número de recolecta, fecha y localización geográfica (municipio, coordenadas y msnm). Las muestras de suelo fueron recolectadas de la siguiente forma: en una superficie de 5 m², se marcaron tres puntos aleatorios en los cuales se recolectó una muestra de los primeros 20 cm de suelo (1 kg aproximadamente), la cual se trasladaron al laboratorio de Parasitología agrícola de la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit en bolsas de plástico, debidamente etiquetadas. Las muestras se conservaron en refrigeración a 4 °C para su posterior procesamiento.

Cuadro 1. Sitios de recolecta de suelo en el estado de Nayarit.

| Localidad | Fecha (Suelo) | Ubicación Geográfica | Altitud (msnm) |
|----------------------|---------------|------------------------------|----------------|
| Chacalilla | 23/10/12 | N 21°38'18" O 105°16'19" | 4 |
| Tepic I | 11/08/12 | N 21°25'45" O 104°53'26" | 942 |
| Tepic II | 22/09/12 | N 21°27'54" O 104°53'17" | 968 |
| San Pedro Lagunillas | 12/10/12 | N 21°12'39" O 104°47'23" | 1189 |
| Carillo Puerto | 12/10/12 | N 21°08'36" O 104°51'40" | 857 |
| Jala | 11/10/12 | N 21° 07'25" O 104°27'08" | 1115 |

Aislamiento de hongos entomopatógenos. Con el fin de aislar los hongos entomopatógenos se llevó a cabo el tamizado del suelo con un tamiz de malla de 0.4 mm con la finalidad de romper y separar los grumos gruesos de suelo y hojarasca, para utilizar la técnica del insecto trampa (Zimmerman, 1986) con adultos del “gusano de harina” *Tenebrio molitor* (Coleoptera Tenebrionidae) reproducidas en Laboratorio. De cada muestra de suelo homogenizada, 500 g se colocaron en un recipiente plástico de 14 x 18 x 6 cm junto a 7 adultos de *T. molitor* y fueron incubadas a 25 °C durante

siete días. Los adultos con sintomatología por infección de hongos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 3% por 3 min, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloro, y se secaron en papel filtro estéril. Los adultos trampa se colocaron en cajas de Petri, incubándose a 25 °C por 12 d. El aislamiento y purificación de los hongos se realizó en cámara de flujo laminar por transferencia directa de conidios y/o micelio a cajas de Petri con medio PDA.

Identificación de los hongos entomopatógenos. Los aislados obtenidos, fueron caracterizados molecularmente al extraer un explante de la colonia del microorganismo purificado, el cual se colocó en cajas de Petri con PDA cubierto con un celofán estéril y se incubó por 7 d a 28 °C. El micelio, se cosecho con la ayuda de una espátula de acero inoxidable y se colocó en un mortero de porcelana al cual se le adicionó buffer de extracción de DNA de hongos filamentosos a 70 °C (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) y se maceró para la extracción del DNA con base en el protocolo descrito por Raeder y Broda (1985); Martínez y Soto (1993). El DNA total obtenido fue examinado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, el cual se utilizó para amplificar el espaciador de transcrito interno (ITS) del 18s del rDNA se utilizó los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), donde el fragmento esperado fue de 710 a 850 pb, dependiendo de la especie de hongo (White *et al.*, 1990). Las condiciones de amplificación se dividieron en cinco etapas; una primera de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos los cuales incluyen la segunda etapa igualmente de desnaturalización a 94 °C por 30 s, una tercera de alineamiento a 60 °C por 30 s, una cuarta de extensión a 72 °C por 45 s, y la quinta etapa de extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación fueron examinados mediante geles de agarosa 1% y posteriormente purificados utilizando un kit DNA Clean & Concentrator de la marca Zymo basado el protocolo del fabricante. Dichos amplicones se enviaron a la empresa Macrogen (Maryland, EUA) donde fueron secuenciados con base el método de Sanger *et al.* (1977) y las secuencias obtenidas se compararon contra la base de datos del banco de genes (NCBI) se usó el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Resultados y Discusión

De las seis muestras recolectadas de suelo, cuatro de ellas fueron positivas a la presencia de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium pingshaense* y *Metarhizium robertsii* (Cuadro 2). De las cuales el género *Metarhizium* spp., presento una mayor presencia. Resultados similares fueron reportados por otros autores para México (Molina *et al.*, 2003). Al respecto Lezama *et al.* (2001) reportaron a *M. anisopliae* con mayor abundancia en muestras de suelo de Michoacán, Colima, Jalisco y Tamaulipas.

Es importante resaltar, que en los sitios en los cuales se reportó a *M. anisopliae* con mayor frecuencia en México, son zonas costeras tropicales en las cuales la humedad relativa y la temperatura son más altas. Asimismo, se conoce que *B. bassiana* sobrevive por más tiempo en áreas de clima templado y donde existen para tener continuidad de su ciclo de infección (Vanninen, 1996).

Los datos de secuenciación mostraron un 88-98% de identidad y máximo score de 669-953 de los aislados con las secuencias del GenBank (Cuadro 2), obtenidos del algoritmo de BLAST en la base de datos NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

Cuadro 2. Hongos entomopatógenos aislados del suelo en el estado de Nayarit.

| Localidad | Entomopatógeno | Cepa/aislado | Identidad (%) | Máximo score | Acceso |
|----------------------|--|-----------------|---------------|--------------|------------|
| Chacalilla | <i>Metarhizium robertsii</i> | Cepa A103 | 92 | 732 | KC355183.1 |
| Tepic I | <i>Beauveria bassiana</i> | aislado BBPTG4 | 98 | 953 | KC759730.1 |
| Tepic II | <i>Metarhizium pingshaense</i> | Cepa ARSEF 2162 | 88 | 669 | HM055447.1 |
| San Pedro Lagunillas | <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> | Cepa ACCC 30130 | 92 | 706 | DQ177431.1 |
| Carillo Puerto | No presentaron | - | - | - | - |
| Jala | No presentaron | - | - | - | - |

Conclusiones

Los hongos entomopatógenos aislados en suelo de agroecosistemas de maíz en el estado de Nayarit fueron *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense* y *M. robertsii*. Estos microorganismos podrían utilizarse en control biológico por incremento, y utilizarse como alternativas al uso de insecticidas químicos, al ser más amigables con la fauna benéfica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Nayarit por el apoyo brindado durante la realización de esta investigación.

Literatura Citada

- Altschul, S. F., GISH, W., Miller, W., Myers, E. W., and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Andrews K. L. 1989. Maíz y sorgo. pp. 34-76 *En: Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: Estado actual y futuro*. K. L. Andrews y J. Rutilio, Eds. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras, 623 p.
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socias, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E. y G. Gastaminza. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Revista Sociedad Entomológica Argentina* 69 (3-4): 209-231.
- De Faria, M. R. y S. P. Wraight. 2007. Mycoinsecticides and micoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and internacional classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237-256.
- Del Rincón, M. C., Méndez, L. J. y J. Ibarra. E. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*, 45 (2): 157-164.
- García, P. F. y F. J. Bahena. 2010. Parasitismo natural sobre gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidóptera: Noctuidae) en el estado de Morelos. *Entomol. Mex.* 1: 99-103.

- Hamm, J. J. 1984. Invertebrate pathology and biological control. *J. Georgia Entomol. Soc.* 19: 6-13.
- Hernández, M. J. L., López, B. E. C., Garza, G. E. and P. N. Mayek. 2008. Spatial distribution of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize landraces grown in Colima, Mexico. *International J. Trop Insect Sci*, 28:126-129.
- Hernández, V. V. M., Cervantes, E. Z., Villalobos, F. J., García, L. L. y C. G. Peña. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.), 27(3): 591-599.
- Lezama, G. R., Ham, J., Molina, O. J., López, E. M., Pescador, R. A., González, R. M. and E. Styler. 2001. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist*, 84: 23-30.
- Martínez, S. T., y C. Y. Soto. 1993. Extracción de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Revista Colombiana de Química*, 22 (1): 79-88.
- Molina, O. J., Lezama, G. R., González R. M., López E. M., Rodríguez V. M. and P. F. Arceo 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in México. *Florida Entomologist*, 86:244-253.
- Morón, M. A. y L. A. Rodríguez del Bosque. 2010. Importancia, historia y retos, pp. 3-17. *In: L. A. Rodríguez del Bosque y M. A. Morón (Eds.). Plagas del suelo. Mundi-Prensa México.*
- Raeder, U. y P. Broda, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.
- Sanger, F., Nicklen, S. and A. R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74(12): 5463-5467.
- Vanninen, I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*, 100: 93-101.
- Villalobos, F. J. 1992. The potential of entomopathogens for the control of white grub pests of corn in Mexico, pp. 253-260. *In: T. A. Jackson & T. R. Glare (Eds.), Use of pathogens in scarab pest management. Intercept. England.*
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In Press, A. (Ed.), PCR protocols: A guide to methods and applications.* 315-322 p.
- Zimmermann, G. 1986. The “*Galleria*” bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102: 213-215.