

Microorganismos benéficos presentes en suelos agrícolas del estado de Guanajuato

B. A. Estrada-Pérez¹, N. Torres-Cruz¹, M. A. Dominguez-Flores¹, A. M. Cruz-Avalos¹.

¹División de Ciencias de la Vida Campus Irapuato-Salamanca
am.cruz@ugto.mx¹

Resumen

En la Agricultura los microorganismos benéficos son una herramienta amigable en diferentes cultivos agrícolas y principalmente para remediar la aplicación de productos químicos que mucho mal le hace al ambiente, al animal y al ser humano, estos mismos son reportados de gran utilidad y seguridad alimentaria. Entre los principales hongos benéficos más utilizados en la agricultura se encuentran el género *Trichoderma*, *Beauveria* y *Metarhizium*. Estos agentes biológicos han probado su eficiencia en el control de plagas agrícolas. En el presente estudio se realizó una colecta de 10 muestras de suelos agrícolas de diferentes municipios (Irapuato, Salamanca, Valle de Santiago y León), y se logró aislar y evaluar 2 cepas de hongos entomopatógenos de los géneros de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, las cuales fueron aisladas de suelos agrícolas, nativas del estado de Guanajuato. Se realizaron Bioensayos burdos en una concentración de 1×10^8 conidios/ml, la cepa de *M. anisopliae* (Ma22) y *B. bassiana* (Bb4), fueron patógenas causando mortalidades del 96% y 99% respectivamente en el insecto plaga *Tribolium confusum* a nivel de laboratorio.

Palabras clave: Microorganismos benéficos, Patogenicidad, *Tribolium confusum*.

Introducción

En los agroecosistemas la productividad depende mayormente de la actividad de diversos microorganismos que establecen relaciones benéficas con las plantas. El efecto benéfico de la interacción planta y microorganismo puede ser resultado de la capacidad de los microorganismos para fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, producir sideróforos y fitohormonas, mejorar la absorción de nutrientes, promover el crecimiento de brotes y raíces, mejorar de la estructura del suelo o actuar como agentes de biocontrol o supresión de organismos patógenos (Rodríguez-Millán *et al.*, 2013). Cuando las condiciones del suelo son óptimas para que los diferentes microorganismos benéficos puedan adecuarse a sustratos, agua disponible, oxígeno, pH y temperatura del medio ambiente estos suelen ser más efectivos. Los microorganismos son usados en la eliminación de problemas asociados con el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, y están siendo aplicados ampliamente en la producción natural y agricultura orgánica (Tanya-Morocho & Leiva-Mora, 2019).

Dentro de los microorganismos benéficos en el suelo se encuentran los microorganismos endófitos; estos son las bacterias y hongos que colonizan los tejidos internos de las plantas sin causarles enfermedades aparentes, además de beneficiarlas al reforzar su tolerancia a condiciones adversas para su desarrollo. Viven durante todo el ciclo de la planta en su interior, en las raíces o en el tejido aéreo, intercambiando nutrientes (Vera-Loor *et al.*, 2018). Los microorganismos endofíticos están implicados en la protección natural de la planta contra enfermedades bacterianas, fúngicas y virales y pueden representar una fuente importante de agentes de control biológico. Estudios recientes han demostrado que *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* son organismos capaces de mejorar la estructura del suelo por lo que se les considera microorganismos benéficos. Crean una resistencia sistémica inducida en la planta hospedadora.

Metarhizium anisopliae y *Beauveria bassiana* son los hongos más estudiados y utilizados puesto que su eficiencia y la facilidad para multiplicarse en laboratorio, los considera uno de los principales grupos de entomopatógenos usados en el control microbiano (Ibarra *et al.*, 2006).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad patogénica de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* obtenidos de suelos agrícolas del estado de Guanajuato, evaluados en el insecto *Tribolium confusum*.

Materiales y Métodos

Sitio experimental

El experimento se llevó a cabo en un laboratorio dentro de las instalaciones de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División Ciencias de la Vida, Ex Hacienda "El Copal" km9; carretera Irapuato-Silao; A. P. 311; C. P. 36500; Irapuato, Guanajuato.

Toma de muestras

Se realizaron muestreos de suelos agrícolas de la zona Bajío Guanajuato; se colectó una muestra de los primeros 15cm de suelo (aproximadamente 1kg) la cual se transportó al laboratorio de DICIVA en bolsas de plástico de 2kg de capacidad, debidamente etiquetadas, dentro de hieleras con la finalidad de evitar temperaturas altas y conservadas en condiciones favorables dentro del laboratorio en DICIVA.

Obtención de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*

De una muestra de suelo se colocaron 300 gramos en un recipiente plástico y se le agregó agua a capacidad de campo. Se utilizó la técnica del insecto trampa con larvas del "gusano de la cera" *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae) (Zimmerman, 1986) reproducidas en laboratorio, agregando 7 larvas que fueron colocadas en la muestra de suelo y previamente humedecido, posteriormente el recipiente fue invertido con la finalidad de que las larvas avanzaran a la superficie y se deja por siete días.

Manejo de larvas infectadas

Pasado el tiempo de los 7 días, las larvas de *Galleria mellonella* se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio, posterior a ello, fueron colocadas en una caja Petri con papel filtro humedecido con agua destilada, la caja fue cerrada, sellada y colocada a temperatura ambiente bajo las condiciones óptimas al hongo.

Aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos de suelos agrícolas

Cuando se detectó el desarrollo de hongo entomopatógenos (esporas del hongo en el insecto) en la superficie de las larvas de *G. mellonella* que fueron puestas en 300 g de suelos durante siete días, se procedió a tomar (esporas) una pequeña parte de este y se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo Dextrosa Agar Saboraud (BB Bioxon) incubando a 25°C (Hatting *et al.*, 1999). Lo anterior se repitió hasta que se logró un cultivo puro (limpio) de cada uno de los hongos.

Reproducción del insecto prueba *Tribolium confusum* para bioensayos

El insecto utilizado para la investigación (Bioensayos) fue *Tribolium confusum* (Coleóptera: tenebrionidae). Se estableció en frascos transparentes con un orificio central en las tapaderas y cubiertos con una malla para que puedan mantenerse dentro del frasco con las condiciones favorables para cumplir su ciclo biológico. Los insectos se mantuvieron bajo condiciones estériles dentro del laboratorio. La dieta fue harina "Maseca" esterilizada por autoclave durante 20 minutos y granos de maíz.

Patogenicidad de hongos entomopatógenos en *Tribolium confusum*

Las cepas de los hongos aislados (Bb4 yMa22) se evaluaron a la concentración 1×10^8 conidios/ml sobre el estado adulto del insecto plaga *Tribolium confusum*, esto de acuerdo con lo reportado por Maniania y Fargues (1985). Se formaron grupos de insectos de 10 unidades, que se colocaron dentro de cajas de Petri de 9.0 cm de diámetro y 1 cm de alto, sobre un círculo de papel filtro húmedo con agua destilada estéril. La inoculación se llevó a cabo mediante la técnica de inmersión de la suspensión de conidios, sobre cada grupo de insecto.

Para cada cepa de hongo se utilizaron cinco repeticiones, cada una formada por un grupo de 10 adultos de insectos plagas; para el testigo se utilizó agua destilada estéril con Tween 80 sobre cada uno de los cinco grupos de 10 insectos. Finalmente se cubrieron e incubaron y cada 24 horas se registró el porcentaje de insectos que presentaron infección por micosis y el tiempo de infección (Samuels *et al.*, 1989). El experimento se desarrolló bajo condiciones de laboratorio, a 25 ± 1 °C de temperatura y se registró la muerte cada dos días, a partir de las 48 horas en un microscópico estereoscópico.

Tratamientos

Para el tratamiento 1 se utilizó el hongo *Metarhizium anisopliae*; y 50 adultos de la cría. Posteriormente fueron colocados en contacto directo con una suspensión de esporas del aislamiento del hongo en una concentración de 1×10^8 conidios/ml, durante 10 segundos, se eliminó el exceso de humedad depositándolos sobre papel estéril y se transfirieron en grupos de 10 insectos a cinco cajas Petri (cajas con un gramo de harina "Maseca". En el fondo de cada caja se colocó un círculo de papel estéril humedecido con agua destilada.

El tratamiento 2 consistió en 50 adultos tratados en contacto directo con una suspensión de esporas del aislamiento de *Beauveria bassiana*.

El tratamiento testigo consistió en 50 adultos tratados con agua destilada estéril.

Se realizaron 4 bioensayos por cada hongo utilizado, cada tratamiento constó de cinco repeticiones y cada 48 horas se realizaba el registro de los diferentes tratamientos.

Resultados y Discusión

Se colectaron 10 muestras de suelos de cultivos agrícolas con el fin de aislar cepas nativas de hongos entomopatógenos. Del total de muestras mencionadas se aislaron en total 2 cepas (positivas) (población de células de una sola especie descendientes de una única célula) distintas, 1 fue del género *B. bassiana* y 1 de *M. anisopliae* (Tabla 1). Los dos aislamientos se identificaron a nivel morfológico y se purificaron mediante replicas sucesivas en medio de cultivo Dextrosa Agar Saboraud (BD Bioxon), hasta obtener aislamientos puros, característicos del género *M. anisopliae* y *B. bassiana* respectivamente (Fig. 1a y b), y *Galleria mellonella* (Fig. 1c)

Tabla 1. Géneros de hongos entomopatógenos aislados de suelos agrícolas en cultivo de diferentes municipios del estado de Guanajuato.

Muestra	Clave del aislado	Huésped/Hábitat	Especie	Año
2	--	Suelo agrícola, Valle de Santiago	---	2023
4	Bb4	Suelo agrícola, Irapuato	<i>Beauveria bassiana</i>	2023
6	--	Suelo agrícola, Salamanca	---	2023
8	--	Suelo agrícola, Irapuato	---	2023
10	--	Suelo agrícola, Irapuato	---	2023
12	--	Suelo agrícola, Valle de Santiago	---	2023
13	--	Suelo agrícola, Irapuato	---	2023
14	--	Suelo agrícola, Irapuato	---	2023
16	--	Suelo agrícola, Irapuato	---	2023
22	Ma22	Suelo agrícola, León	<i>Metarhizium anisopliae</i>	2023

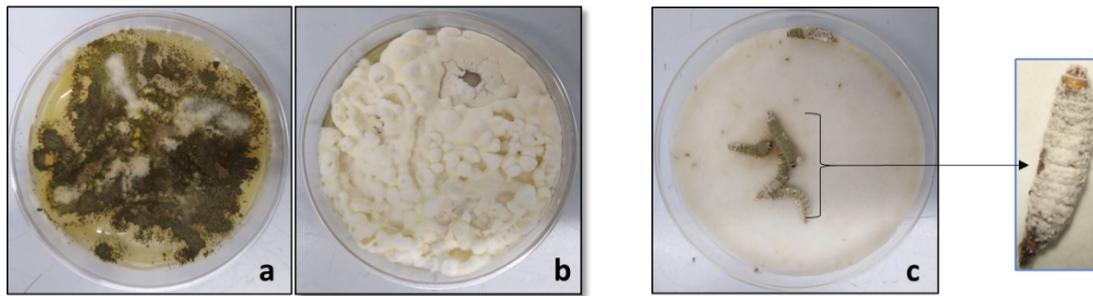


Figura 1. a y b) hongo purificado de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, c) Larva de *G. mellonella* micosadas con el hongo *M. anisopliae*.

Patogenicidad de hongos entomopatógenos en *Tribolium confusum*

El aislamiento de *M. anisopliae* (Ma22) y *B. bassiana* (Bb4), fueron patógenos en el insecto adulto de *Tribolium confusum* (Figura 6) a la concentración de 1×10^8 conidios/mL.

El análisis estadístico ANOVA da como resultado una media de infección de 99% y 96% para *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* respectivamente; por lo tanto, ambos microorganismos son efectivos en el insecto plaga en su estado adulto. Tanto el tratamiento 2 como el tratamiento 1 demostraron infectar de manera significativa a los adultos de *T. confusum* en comparación con el tratamiento testigo.

Cruz-Avalos *et al.*, (2019) reportaron la actividad insecticida de *M. anisopliae* y *B. bassiana* contra larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* con porcentajes de mortalidad del 100% a la concentración de 1×10^8 conidios/ml, bajo condiciones de laboratorio. Los resultados de Bustillo (2011) demostraron que la cepa MaF1309 de *M. anisopliae* es eficaz para el control de *Rhipicephalus microplus* en condiciones *in vitro*, siendo la concentración de 1×10^8 conidios/ml la que presentó mejores resultados, con una eficacia del 90%.

En las tablas 2, 3, 4 y 5, se muestran los resultados de esta investigación en el cual se presentan las diferencias estadísticas entre tratamiento, así como la media de cada uno y el número de repeticiones por tratamiento. En el bioensayo realizado el día 27 de junio es el único donde se presentan diferencias significativas entre tratamientos, perteneciendo cada uno a un grupo estadístico diferente; siendo la cepa *B. bassiana* más efectiva al aplicarse en el insecto plaga a la misma concentración (1×10^8 conidios/ml). En las tablas 3, 4, 5 y 6, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos aplicados, considerando a los dos igual de efectivos al aplicarse en el estado adulto de *T. confusum*, así mismo, las figuras 2,3,4 y 5 muestran los porcentajes de infección de cada bioensayo a las 48, 96 y 144 horas.

Tabla 2. Medias por tratamiento del bioensayo realizado el 27 de junio

Tratamiento	Medias	N	Grupo estadístico
<i>B. bassiana</i>	10	5	a
<i>M. anisopliae</i>	9.4	5	b
Testigo	0	5	c

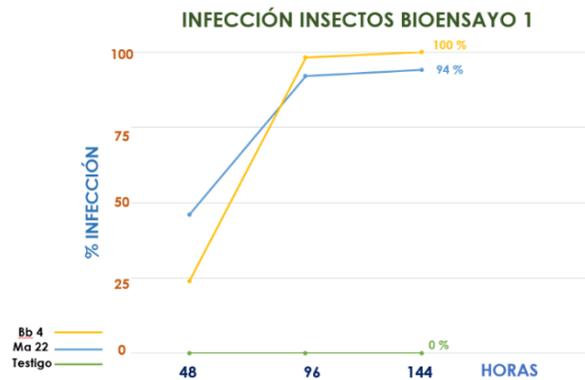


Figura 2. Porcentaje de infección del bioensayo 1 a las 48, 96 y 144 horas.

Tabla 3. Medias por tratamiento del bioensayo realizado el 29 de junio

Tratamiento	Medias	N	Grupo estadístico
<i>M. anisopliae</i>	10	5	a
<i>B. bassiana</i>	10	5	a
Testigo	0	5	b

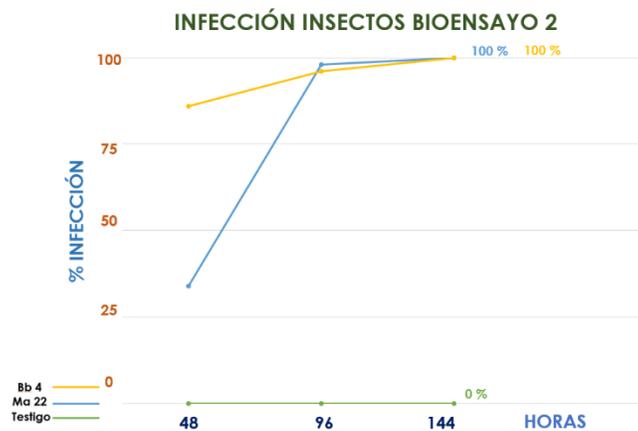


Figura 3. Porcentaje de infección del bioensayo 2 a las 48, 96 y 144 horas.

Tabla 4. Medias por tratamiento del bioensayo realizado el 3 de julio

Tratamiento	Medias	n	Grupo estadístico
<i>M. anisopliae</i>	9.8	5	a
<i>B. bassiana</i>	9.4	5	a
Testigo	0	5	b

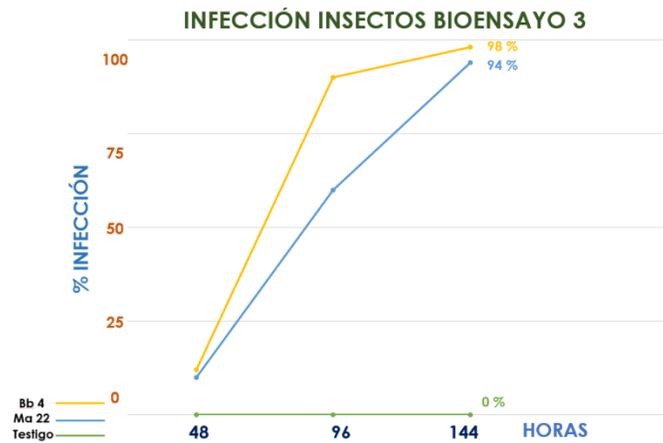


Figura 4. Porcentaje de infección del bioensayo 3 a las 48, 96 y 144 horas.

Tabla 5. Medias por tratamiento del bioensayo realizado el 5 de julio

Tratamiento	Medias	n	Grupo estadístico
<i>M. anisopliae</i>	9.6	5	a
<i>B. bassiana</i>	9.9	5	a
Testigo	0	5	b

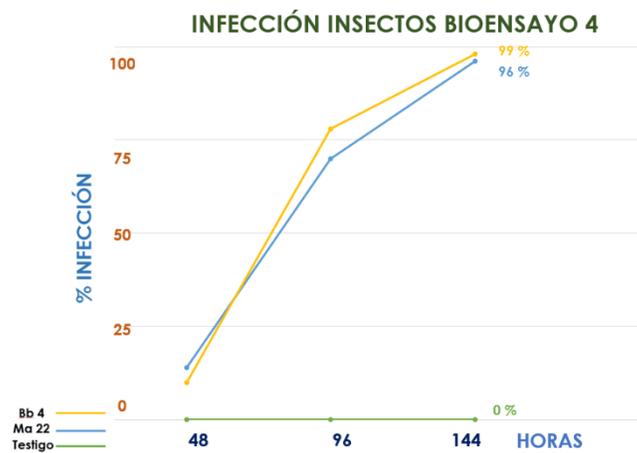


Figura 5. Porcentaje de infección del bioensayo 4 a las 48, 96 y 144 horas.

Tabla 6. Medias por tratamiento obtenidas del resultado de los cuatro bioensayos

Tratamiento	Medias	n	Grupo estadístico
<i>M. anisopliae</i>	9.6	4	a
<i>B. bassiana</i>	9.9	4	a
Testigo	0	4	b

En la tabla seis se indican las medias obtenidas de los registros de los cuatro bioensayos realizados, los tratamientos aplicados, las repeticiones y el grupo estadístico al que pertenecen; tanto *Beauveria bassiana* como *Metarhizium anisopliae* pertenecen al mismo grupo.

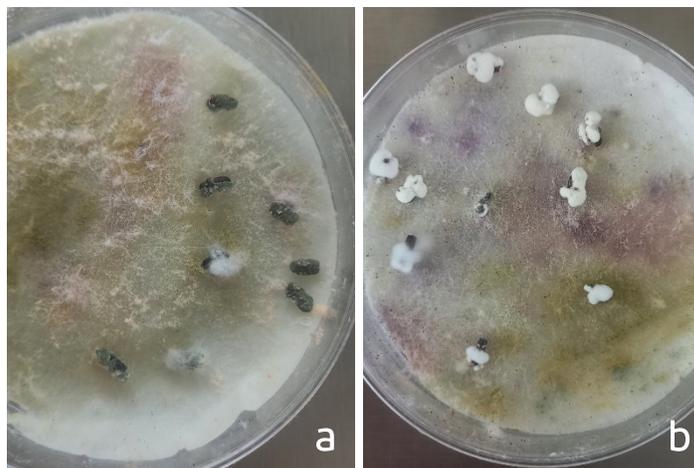


Figura 6. a) Insectos *T. confusum* infectados por *M. anisopliae* b) Insectos infectados por *Beauveria bassiana*.

Conclusión

La cepa de *Metarhizium anisopliae* Ma22 y la cepa de *Beauveria bassiana* Bb4 pueden ser consideradas como control biológico en el insecto plaga *Tribolium confusum* causando una mortalidad del 96% y 99% respectivamente, en una concentración de 1×10^8 conidios/ml.

Bibliografía/Referencias

- Cruz-Avalos A. M., Bivián-Hernández M. A., Ibarra J. E. & Rincón.Castro M. C. 2019. Alta virulencia de hongos entomopatógenos mexicanos contra el gusano cogollero (Lepidoptera: Noctuidae), *Journal of Economic Entomology*, 112 (1), 99–107.
- Hatting, J. L., Humber R. A., Poprawski T. J. and Miller, R.M. 1999. A survey of fungal pathogens from South Africa with special reference to cereal aphids. *Biocontrol*. 16: 1-12.
- Ibarra J.E., Del Rincón C. M. C., Galindo E., Patiño M., Serrano L., García R., Carrillo J.A., Pereyra A.B., Alcázar P.A., Luna O.H., Galán W.L., Pardo L., Muñoz G.C., Gómez I., Soberón M. y Bravo A. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2), 113-120.
- Maniania N. K. & Fargues J. 1985. Susceptibility of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to the fungal pathogens *Pae-cilomyces fumosoroseus* and *Nomurea rileyi*. *Florida Entomologist* 68, 178-183.

- Rodríguez-Millán K. A., Monreal-Vargas C. T., Huerta-Díaz J., Soria-Colunga J. C., & Jarquín-Gálvez R. 2013. Aporte de Microorganismos Benéficos por la Incorporación al Suelo de Residuos Deshidratados de Col (*Brassica oleracea* var *capitata*) y su Efecto en el pH. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(1), 29-44.
- Samuels, K. D. Z., Heale, J. B. y Llewellyn, M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 25-31.
- Sánchez-Fernández R. E., Sánchez-Ortiz B. L., Sandoval-Espinosa Y. K. M., Ulloa-Benítez Á., Armendáriz-Guillén B., García-Méndez M. C., & Macías-Rubalcava M. L. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), 132-146.
- Tanya-Morocho M. & Leiva-Mora M. 2019. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46(2), 93-103.
- Vera-Loor M. A., Bernal-Cabrera A., Leiva-Mora M. Vera-Loor A. E. A., Vera-Coello D., Peñaherrera-Villafuerte S., Solís-Hidalgo K., Terrero-Yépez P. & Jiménez-Guerrero V. E. 2018. Microorganismos endófitos asociados a *Theobroma cacao* como agentes de control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Centro Agrícola*, 45(3), 81-87.
- Zimmermann, G. 1986. The "*Galleria*" bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102: 213-215.