

Artículo:

Aislamiento nativo de *Metarhizium* spp. de dos localidades de Tantoyuca, Veracruz

Native isolation of *Metarhizium* spp. from two localities in Tantoyuca, Veracruz

Lorena-Guadalupe Morales-Meléndez¹, Armando Arrieta-González¹, Karla-Lissette Silva-Martínez¹, José-Manuel Jáuregui-Wade², Óscar Del-Ángel-Piña¹

Revista Interdisciplinaria de
Ingeniería Sustentable y Desarrollo
Social (RIISDS)

¹ Tecnológico Nacional de México – ITS de Tantoyuca, Veracruz, México.

² Tecnológico Nacional de México – ITS de Chicontepec, Veracruz, México.

* Autor correspondiente: karla.silva@itsta.edu.mx

Recibido: 21 de octubre de 2024

Aceptado: 27 de noviembre de 2024

Publicado: 20 de diciembre de 2024

Publicación anual editada por el
Instituto Tecnológico Superior de
Tantoyuca

Desv. Lindero Tametate, S/N
Col. La Morita
C.P. 92100
Tantoyuca, Veracruz, México.
Teléfono: 789 8931680, Ext.196.

Correo electrónico:
revistadigital@itsta.edu.mx

Sitio WEB
<https://itsta.edu.mx/revistadigital>

ISSN 2448-8003

Editor responsable:
Dr. Horacio Bautista Santos

Copyright: Este artículo es de acceso
abierto distribuido bajo los términos y
condiciones de la licencia Creative
Commons
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Resumen: El objetivo de este trabajo fue aislar cepas nativas del género *Metarhizium* spp. para el control de insectos plaga presentes en el cultivo de maíz mediante la técnica de insecto trampa en diferentes sitios en el municipio de Tantoyuca, Veracruz. Se realizaron muestreos en dos localidades: el Abra con 6 muestreos y Negrital con 9 muestreos. Se aislaron en el primer muestreo 6 cepas nativas de *Metarhizium* spp. 5 provenientes de la localidad de Negrital y 1 en Abra, se realizó un segundo muestreo y se comprobó que los aislados fueron positivos en los sitios muestreados. Estos fueron purificados, caracterizados e identificados en microscopio utilizando las claves taxonómicas de Barnett. El aislado TNe_310922 presentó un crecimiento promedio de 0.49 cm diarios, mientras que el aislado TPc_310922 presentó 0.20 cm. La presencia de micosis de TNe_310922 se presentó en un 62.5%, superior TPc_310922 con 50% a las 216 horas de infección. Se concluyó que el aislado TNe_310922 mostró un gran potencial in vitro, indicando que podría ser un aislado muy prometedor para realizar evaluaciones en campo.

Palabras clave: Entomopatógenos, Patogénico, Control biológico.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue aislar cepas nativas del género *Metarhizium* spp. para el control de insectos plaga presentes en el cultivo de maíz mediante la técnica de insecto trampa en diferentes sitios en el municipio de Tantoyuca, Veracruz. Se realizaron muestreos en dos localidades: el Abra con 6 muestreos y Negrital con 9 muestreos. Se aislaron en el primer muestreo 6 cepas nativas de *Metarhizium* spp. 5 provenientes de la localidad de Negrital y 1 en Abra, se realizó un segundo muestreo y se comprobó que los aislados fueron positivos en los sitios muestreados. Estos fueron purificados, caracterizados e identificados en microscopio utilizando las claves taxonómicas de Barnett. El aislado TNe_310922 presento un crecimiento promedio de 0.49 cm diarios, mientras que el aislado TPc_310922 presento 0.20 cm. La presencia de micosis de TNe_310922 se presentó en un 62.5%, superior TPc_310922 con 50% a las 216 horas de infección. Se concluyo que el aislado TNe_310922 mostró un gran potencial in vitro, indicando que podría ser un aislado muy prometedor para realizar evaluaciones en campo.

Palabras clave: Entomopatógenos, Patogénico, Control biológico.

Abstract

The objective of this study was to isolate native strains of *Metarhizium* spp. for the control of pest insects present in maize crops using the insect trap technique at different sites in the municipality of Tantoyuca, Veracruz. Sampling was conducted in two locations: El Abra with 6 samples and Negrital with 9 samples. In the first sampling, 6 native strains of *Metarhizium* spp. were isolated, 5 from Negrital and 1 from El Abra. A second sampling confirmed that the isolates were positive at the sampled sites. These isolates were purified, characterized, and identified under a microscope using Barnett's taxonomic keys. The isolate TNe_310922 showed an average growth of 0.49 cm per day, while the isolate TPc_310922 showed 0.20 cm. The presence of mycosis in TNe_310922 was observed in 62.5%, higher than TPc_310922, which showed 50% after 216 hours of infection. It was concluded that the TNe_310922 isolate demonstrated significant in vitro potential, suggesting it could be a promising isolate for field evaluations.

Keywords: Entomopathogens, Pathogenic, Biological control.

Introducción

Los hongos entomopatógenos forman un grupo de más de 100 géneros, aunque solo una pequeña fracción de estos se ha incorporado a programas de control biológico. Algunos de estos géneros tienen un amplio rango de hospedadores y pueden ser aislados en diversas regiones geográficas, lo que evidencia la gran diversidad genética que puede existir entre los aislamientos de una misma especie.

Estos hongos contribuyen naturalmente a la reducción de las poblaciones de insectos. Por esta razón, es fundamental que en los programas de control biológico y manejo integrado de plagas se reúnan, purifiquen y conserven estos microorganismos. Esto permitirá seleccionar aquellos que, según sus características, sean más adecuados para ser utilizados en estrategias de control biológico (Humber, 2012).

Muchos de los agentes patógenos están presentes de forma natural en los ecosistemas, aunque algunos tienen bajos niveles de infección en las poblaciones de insectos. Durante la temporada de lluvias, la alta humedad aumenta la probabilidad de encontrar insectos infectados de manera natural (Lacey y Solter, 2012).

Este estudio tiene como objetivo aislar cepas nativas de *Metarhizium* spp. del municipio de Tantoyuca, Veracruz, ya que estos hongos son capaces de infectar insectos en diferentes estadios de su ciclo de vida, lo que permitiría controlar biológicamente las poblaciones de insectos que afectan los cultivos agrícolas de la región.

Materiales y métodos

Área de estudio.

Se realizaron colectas en la Localidad el Abra con coordenadas 21°35'93" N, - 98°24'72" S, Altitud de 188 msnm y localidad de Negrital con coordenadas 21°41'92" N, 98°26'28" S, Altitud de 183 msnm pertenecientes al municipio de Tantoyuca, Veracruz.

Colecta de muestras de suelo

La época de muestreo se consideró mediante la metodología de Tondoh y Lavelle (2005), lo cual señala que la época más recomendable es durante y hacia finales de la época

de lluvias con la opción de tomar muestras adicionales durante la época de secas. Las muestras fueron tomadas a los primeros 20 cm de profundidad tomando como referencia la abundancia de materia orgánica en descomposición presente, utilizando una pala de excavación. Las muestras fueron etiquetados y depositadas en bolsas de plástico con capacidad de 2 kg, y trasladados al laboratorio del Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca para su procesamiento (Figura 1).



Figura 1. Sitios muestreados que salieron positivos a *Metarhizium* spp. de primera y segunda colecta.

Técnica de insecto trampa

Se utilizó la técnica de insecto trampa para aislar hongos entomopatógenos (HE) de acuerdo con lo descrito por Keller et al., (2003), el método de insecto trampa con *G. mellonella* para la colecta de HE, es más sensible, siendo útil para el aislamiento y la identificación de hongos de interés. Por ello, se optó por esta técnica del insecto trampa considerada como un método de aislamiento selectivo.

Se depositaron 10 larvas de *G. mellonella* en los frascos procesados y se sellaron con tapas de plástico. Se incubaron a temperatura ambiente durante 10 días. Se homogeneizó la muestra cada 24 h y la humedad requerida se estabilizó agregando agua potable.

Purificación de cepas nativas

A los diez días de incubación se encontraron larvas de *G. mellonella* micosadas con coloración verde olivo y otros con coloración blanco. La purificación se llevó a cabo del traspaso directo del inóculo de larvas con presencia de micelio a cajas Petri con medio de cultivo selectivo mediante contacto de la larva con asa bacteriológica. El medio de cultivo se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante con algunas modificaciones. Se disolvió 39 g de BD en un litro de agua destilada.

Pruebas de eficiencia de aislados nativos de *Metarhizium* spp.

Se realizaron pruebas de eficiencia de los aislados nativos obtenidos en dos sitios. Se realizaron con larvas de gusano cogollero. La técnica empleada para este caso fue la de inmersión descrita por Ramírez et al., (2019). Se mantuvo en observación durante un periodo de 192 h, cada 24 h se realizaba una observación visual cuantificando el número de insectos muertos y cada uno de ellos se colocó en cajas de Petri y luego encubadas a 26°C para acelerar la esporulación del hongo y así poder confirmar la infección del insecto (Zimmermann, 1986).

Resultados y discusión

Aislamiento de *Metarhizium* spp. en sitios muestreados

Las muestras de suelo recolectadas en dos localidades del municipio de Tantoyuca resultaron positivas para *Metarhizium* spp. La localidad de Negrital presentó el mayor número de aislamientos. En el primer muestreo, se detectaron cinco posibles cepas nativas de *Metarhizium* spp., datos que fueron confirmados mediante un segundo muestreo, en el cual todas las muestras colectadas dieron positivo. Por otro lado, en la localidad de Abra, se obtuvo un solo aislamiento de un total de seis muestras recolectadas, el cual fue también confirmado en el segundo muestreo. Los aislamientos fueron identificados como TNe_310922 y TPc_310922 (denominación que corresponde a un aislamiento nativo proveniente de la localidad de Negrital y uno de la localidad Abra municipio de Tantoyuca, respectivamente, seguido de la fecha de aislamiento) (Figura 2).

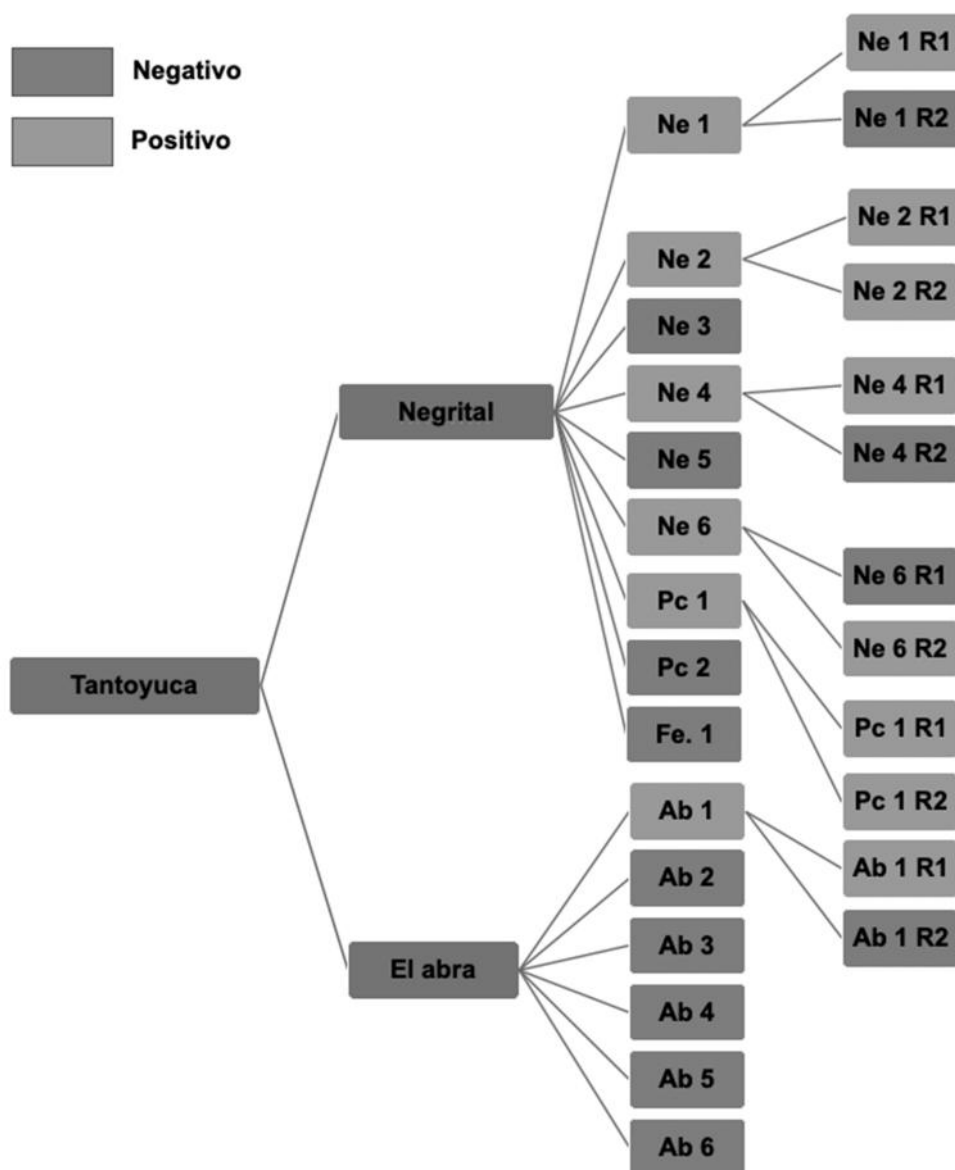


Figura 2. Sitios muestreados que salieron positivos a *Metarhizium* spp. de primera y segunda colecta.

Prueba de eficiencia de aislados nativos

Factores como la producción de proteasas, esterasas, quitinasas, lipasas y toxinas son los responsables de determinar la patogenicidad de un hongo entomopatógeno (Pal et al., 2007; Schrank y Vainstein, 2010; Obando et al., 2013). El uso de *Galleria mellonella* como insecto trampa, resultó eficiente, con resultados similares por Garcés-García et al, 2022, quienes encontraron hongos entomopatógenos mediante este método. La prueba de mortalidad indica que los aislados TNe_310922 y TPc_310922 tienen efecto insecticida

sobre larvas de *S. frugiperda*, ya que el tiempo letal media se presentó a las 96 horas después de la inoculación. Ambos aislados presentaron ese tiempo, sin embargo, no todos presentaron micosis sobre larvas muertas.

Caracterización macroscópica del crecimiento de los aislados en medio de cultivo

Durante los primeros seis días de incubación, se observó un crecimiento radial uniforme en ambos aislados. El aislado TNe_310922 mostró un crecimiento circular blanco y plano en las primeras 48 horas, con una expansión uniforme. A las 72 horas, el centro comenzó a adquirir un color verde olivo, rodeado de un anillo blanco. A las 96 horas, el centro presentó una coloración amarillenta circular, la cual progresó a medida que el crecimiento cubría la superficie de la caja de Petri.

Estas características fueron consistentes con las observadas por García-Gutiérrez et al. (2020) y Gato-Cárdenas et al. (2016). Esta similitud macroscópica puede atribuirse al hecho de que se utilizó la misma especie de cepa. El crecimiento de la colonia se presentó de forma circular y con una expansión moderada, alcanzando los 36 mm a los 8 días, lo cual es comparable a los resultados reportados por Ruíz-Sánchez et al. (2011), quienes, al evaluar el crecimiento micelial de *M. anisopliae* sobre SDA a 27 ± 3 °C, encontraron una velocidad de crecimiento de 0.31 a 0.37 cm/día. Sin embargo, García et al. (2011) reportaron un crecimiento más lento al cultivar *M. anisopliae* en PDA a 25 ± 2 °C, con un diámetro de 25 mm en 10 días. Por otro lado, el aislado TPc_310922 comenzó su desarrollo a las 48 horas post-siembra, adoptando una forma acuminada en el centro, con una coloración amarillenta y exudado transparente abundante, como se muestra en la Figura 3. A las 72 horas, se observó una tonalidad amarillenta pálida, con la presencia de exudado transparente en el centro y anillos blancos en los márgenes. A las 144 horas, se evidenció un cambio a un color verde olivo en el centro, el cual avanzó lentamente a medida que el crecimiento progresaba y llenaba la caja de Petri.

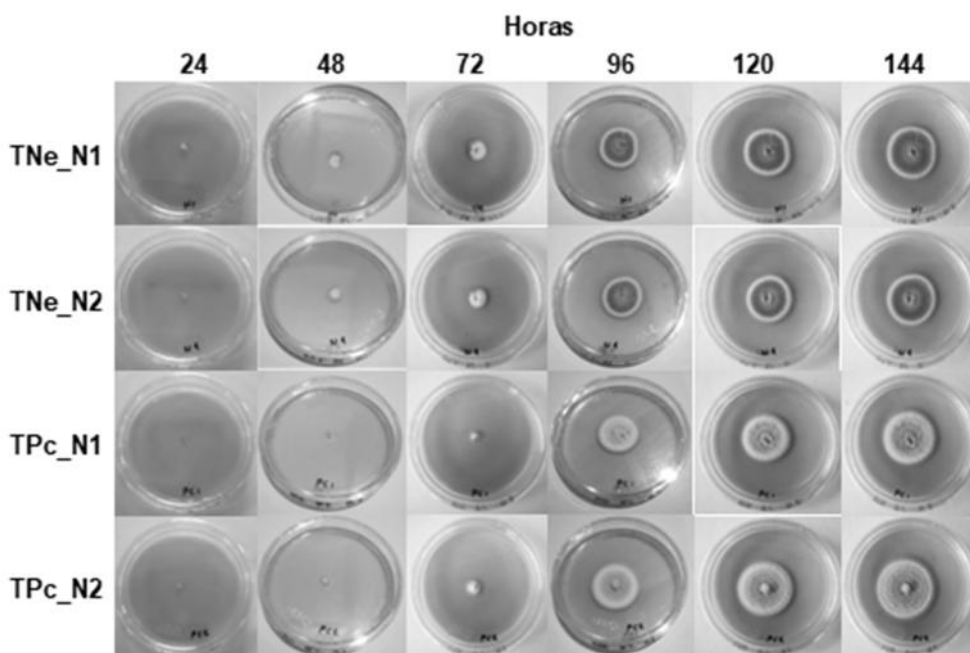


Figura 3. Caracterización morfológica de aislados nativos de *Metarhizium* spp.

Caracterización macroscópica de larvas micosadas.

Para las pruebas de patogenicidad se usaron larvas de *Spodoptera frugiperda*, estas larvas murieron a las 96 horas después de la inoculación, en ese tiempo las características macroscópicas se presentaron en la cutícula de las larvas infectados, mostraron el crecimiento del hongo sobre las larvas. La mayor esporulación se presentó en el aislado TNe_310922 con 62.5% de micosis en la larva, como se muestra en Figura 4, esto demuestra que, en condiciones favorables, el hongo puede completar su ciclo biológico y puede volver a infectar a otros insectos. Sin embargo, Ramos et al. en 2024, obtuvieron menor al 31% de infección utilizando *M. rileyi* (nativos) sobre pruebas de patogenicidad sobre *S. frugiperda*, en una primera colecta, en la segunda este porcentaje aumento hasta el 90%, lo que indica que estos insectos son susceptibles a este hongo entomopatógenos. Yan-li y colaboradores, en el año 2022 identificaron diferentes hongos nativos aislados de *S. frugiperda* entre ellos *Metarhizium rileyi*, lo que concuerda con este estudio al utilizar larvas de *S. frugiperda* como prueba de patogenicidad.

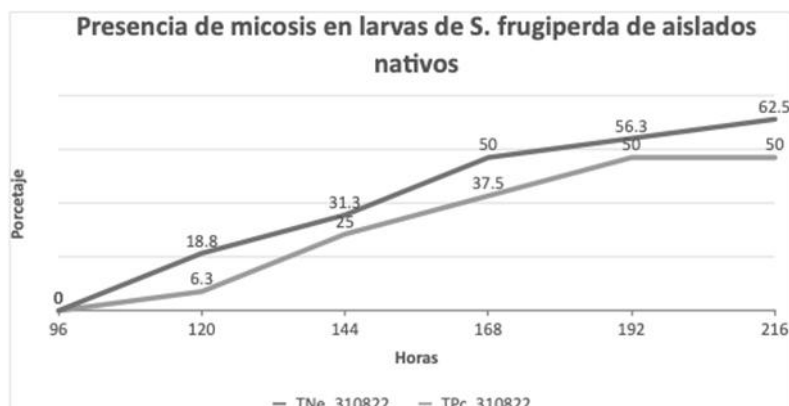


Figura 4. Presencia de micosis en larvas

Conclusiones

La realización de este proyecto permitió comprobar la viabilidad del aislamiento de hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* spp. en distintas zonas del municipio de Tantoyuca, Veracruz. La caracterización de los aislados de *Metarhizium* spp. sobre larvas reveló un efecto significativo sobre el desarrollo micelial, observándose alteraciones notables a los 9 días post-inoculación. Estos resultados sugieren que las cepas de *Metarhizium* spp. tienen la capacidad de prevalecer en condiciones más adversas de lo que inicialmente se había recomendado, lo que las convierte en potenciales agentes biológicos efectivos para el control de insectos plaga.

De acuerdo con los datos obtenidos, se concluye que el aislado TNe_310922 muestra un mayor potencial para su uso en evaluaciones de campo. Este aislado presentó un crecimiento promedio de 0.49 cm por día, superior al de TPc_310922, que mostró un crecimiento de 0.20 cm diarios. Además, la presencia de micosis en TNe_310922 alcanzó un 62.5%, superando el 50% observado en TPc_310922 a las 216 horas post-infección. Por lo tanto, el aislado TNe_310922 es considerado el candidato más prometedor para su aplicación en estrategias de control biológico en campo.

Agradecimientos

Al Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca por facilitarnos el acceso a laboratorio para la realización de la presente investigación. A la Dirección del Departamento de Ganadería del H. Ayuntamiento del Municipio de Tantoyuca, Veracruz.

Referencias bibliográficas

- Garcés-García, R., Barrón-Bravo, O. G., Ángel-Sahagún, C. A. y Molina-Ochoa, J. (2022). Presencia de nemátodos entomopatógenos en suelos pecuarios de Altama, Tamaulipas. Revista Interdisciplinaria de ingeniería sustentable y desarrollo social. 8(2), 44-45 pp <https://itsta.edu.mx/wp-content/uploads/2022/03/RIISDS-Memoria-Suplemento-012022.pdf>
- García-Gutiérrez, C., García-Guajardo, M. I., Vejar-Cota, G., Meza-García, L., y Chávez-Medina, J. A. (2020). Macromorfología y crecimiento radial de cepas de hongos entomopatógenos suplementado con polvo de lepidópteros. Revista colombiana de entomología, 46(1), e10164. <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i1.10164>
- Gato-Cárdenas, Y., Márquez-Gutiérrez, M. E., Baró-Robaina, Y., Porras-González, Á., Ulloa-Martín, Y., y Quesada-Mola, Y. (2016). Caracterización de aislados cubanos del complejo de especies *Metarhizium anisopliae* con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). Revista de Protección Vegetal, 31(1), 50-56. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Humber, R.A. (2012). Identificación de hongos entomopatógenos. In: L. Lacery (ed.), Manual de técnicas en patología de insectos. Segunda Edición Academic Press. pp. 412-484.
- Keller, S., P. Kessler y C. Schweizer. 2003. Distribución de hongos patógenos del suelo en Suiza con especial referencia a *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol, 48:307-319.
- Lacey, L. A., & Solter, L. F. (2012). Initial handling and diagnosis of diseased invertebrates. Manual of techniques in invertebrate pathology, 2, 1-13.

- Obando, J. A., Bustillo, A. E., Castro, U., & 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.
- Pal, S.; St Leger, R. J.; Wu, L. P. 2007. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 8969-8977.
- Ramírez, S. C.J, Morales, F. F.J., Alatorre, R. R, Covarrubías, J. M., Méndez S. Gallegos, J. (2019). Efectividad de hongos entomopatógenos sobre la mortalidad de "*Dactylopius opuntiae*" (Hemiptera: Dactylopiidae) en condiciones de laboratorio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, ISSN 2007-0934, No.22, pp. 1-14. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6877546>
- Ramos, Y., Pineda-Guillermo, S., Tamez-Guerra, P., Orozco-Flores, A. A., Figueroa de la Rosa, J. I., Ramos-Ortiz, S., ... & Martínez-Castillo, A. M. (2024). Natural Prevalence, Molecular Characteristics, and Biological Activity of *Metarhizium rileyi* (Farlow) Isolated from *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) Larvae in Mexico. *Journal of Fungi*, 10(6), 416.
- Sánchez, J., Valle, J., Pérez, E., Neira, M., & Calderón, C. (2019). Biological control of *Spodoptera frugiperda* in *Zea mays* culture: Use of entomopathogenic nematodes. *Scientia agropecuaria*, 10(4), 551-557. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.12>
- Schrank, A.; Vainstein, M. H. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267-1274.
- Tondoh, J. E., & Lavelle, P. (2005). Population dynamics of *Hyperiodrilus africanus* (Oligochaeta, Eudrilidae) in Ivory Coast. *Journal of tropical ecology*, 21(5), 493-500.
- Yan li, Z., Hui, D., Li sheng, Z., Zu min, G., & Jin cheng, Z. (2022). High virulence of a naturally occurring entomopathogenic fungal isolate, *Metarhizium* (Nomuraea) *rileyi*, against *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Applied Entomology*, 146(6), 659-665.
- Zimmermann, G. (1986). The "Galleria" bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102: 213-215. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912.x>