



AISLAMIENTOS FUNGOSOS nativos del estado de Chihuahua, patógenos de *Brachystola magna*

GERARDO BARAJAS ONTIVEROS, ELIO MINEL DEL POZO, MARÍA DE LOURDES RODRÍGUEZ AGUILAR,
ABDÓN PALACIOS MONÁRREZ y J. GUILLERMO HERMOSILLO NIETO
Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales/-Universidad Autónoma de Chihuahua

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es originario de América, domesticado en México, Perú y Colombia y de ahí distribuido al resto del mundo; en el estado de Chihuahua se siembran aproximadamente 130,000 hectáreas con

una media de producción de 719kg/ha (CAB International, 2006). El cultivo del frijol se ha visto afectado por una serie de plagas, por lo que no expresa su total potencial de rendimiento. Entre estas plagas, la que sobresale es el chapulín frijolero (*Brachistola magna*), que llega a causar daños entre 60 y 80% de la superficie sembrada (CESAVECH, 2009).



Para el control de esta plaga se ha hecho un uso exagerado de agroquímicos, generalmente basados en paratión metílico, que además de ser de uso prohibido y tener un efecto de amplio espectro, genera resistencia de plagas por su presión de selección, resurgimiento de plagas secundarias a primarias, altos costos del cultivo y efectos directos al medio ambiente y en el ser humano. Lo anterior es una razón suficiente para la búsqueda de nuevas alternativas de control del chapulín frijolero en el estado de Chihuahua, para lo cual nos dimos a la tarea de realizar una búsqueda de agentes de control biológico presentes en forma natural en dicha región, con el objetivo de iniciar una cultura de control biológico del chapulín frijolero entre los productores.

Metodología

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación, Conservación y Reproducción de Organismos Benéficos (CICROB) de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma de Chihuahua, en ciudad Delicias, Chihuahua, México. Los materiales utilizados (muestras de suelos e insectos para los bioensayos) fueron obtenidos en la región frijolera del estado de Chihuahua, ubicada en la altiplanicie mexicana, con altitudes promedio que van desde los 1,000 a 2,000 m.s.n.m. (Maciel y Casillas, 1994). Esta región es considerada zona de pastizales y hábitat natural del chapulín (*B. magna*), con una precipitación promedio anual de 500 mm. En toda la zona de muestreos, las temperaturas durante el verano son altas (hasta 38 °C) desde las 11:00 hasta las 17:00 horas, mientras que en las noches y al inicio de las mañanas son frescas (alre-

dedor de 20 °C), aunque en el invierno pueden descender hasta 10 °C bajo cero. La distribución de *B. magna* (figura 1) se extiende desde la zona media de los Estados Unidos hacia el sur hasta alcanzar Chihuahua (mayor intensidad en la franja media), Durango y Zacatecas, estados de la república mexicana (USDA, 1999).

Los muestreos se realizaron quincenalmente, en el periodo abril-octubre, del 2002 al 2004, en áreas representativas de la región frijolera (temporalera) del estado de Chihuahua, pertenecientes a los municipios de Delicias, Saucillo, General Trías, Cuauhtémoc y Casas Grandes en la zona de pastizales (figura 1) y en comunidades intermedias como Orranteño y Las Varas, en donde se ubicaron plantaciones de diversos cultivos con presencia de *B. magna*. Los muestreos consistieron de:

- 100 ninfas por área, colectadas al azar, de los distintos estadios de desarrollo.
- Insectos encontrados muertos en cualquier estadio de desarrollo.
- Cinco muestras de suelo por área, tomadas de los primeros 15 cm del perfil, de lugares con baja perturbación.

El material colectado fue llevado al laboratorio para las observaciones correspondientes y desarrollar los procedimientos encaminadas a la detección y aislamiento de hongos patógenos de *B. magna*. Los insectos vivos se colocaron aislados y se alimentaron convenientemente, hasta su muerte. Los especímenes muertos, tanto los colectados en el campo como los que murieron en el laboratorio, se esterilizaron externamente con hipoclorito de sodio al 3%, se enjuagaron tres veces



Figura 1. Distribución geográfica de *B. magna*.

con agua destilada estéril y se colocaron en “cámara húmeda” con el fin de que se manifestaran los síntomas de la enfermedad fungosa, si fuera el caso. Cuando se evidenció la presencia de un hongo sobre el insecto muerto se procedió a su aislamiento, según la metodología descrita por Goettel e Inglis (1997).

Con respecto al material de suelo, se utilizó la técnica del “insecto cebo”, descrita por Zimmermann (1986), utilizando larvas de *Galleria mellonella* L. A partir de las cinco muestras de cada área se obtuvo una muestra compuesta, la cual se limpió de rocas y restos vegetales y se humedeció. Se utilizaron vasos plásticos de 200 ml, los cuales se llenaron con el suelo húmedo, y sobre este se colocaron cinco larvas, para posteriormente cerrar cada vaso con una tapa de placa Petri (figura 2). Los vasos fueron colocados sobre una mesa en el laboratorio, a una temperatura de 24.91 ± 1.19 °C. Para asegurar un buen contacto de las larvas con el suelo, los vasos fueron invertidos cada 48 horas. La revisión de las larvas se realizó a los 8 días y aquellas que resultaron muertas recibieron el mismo tratamiento descrito en el párrafo anterior.



Figura 2. Aislamiento de hongos a partir de muestras de suelo, usando larvas de *G. mellonella* como “insecto cebo”.

En la medida que se iban obteniendo los aislamientos de los hongos y se disponía de un cultivo puro del mismo, se procedió a comprobar su patogenicidad sobre ninfas de 3o. o 4o. instar de *B. magna*, para lo cual, a partir de una colonia bien desarrollada sobre *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA, Bioxon) se preparó una suspensión de conidios en agua destilada estéril más *tween* 80 al 0.05% y con ella fueron tratados 10 insectos por inmersión durante un minuto, después de lo cual fueron colocados individualmente en placas Petri,

alimentados con un trozo de lechuga fresca (*Lactuca sativa* L.) diariamente y mantenidas en el laboratorio a una temperatura de 24.91 ± 1.19 °C, registrándose como “positivos” a aquellos aislamientos que fueron capaces de infectar al menos un insecto de los tratados, en el plazo de 10 días.

Con los aislamientos que resultaron patogénicos sobre *B. magna* se procedió a su caracterización morfológica e identificación. La identificación estuvo basada en las características de crecimiento de los hongos sobre el cadáver del insecto, en las características culturales, en la morfología y disposición de células conidiógenas y de los conidios, y en la identidad del hospedante, según lo recomendado por Samson *et al.* (1988), Goettel e Inglis (1997) y Humber (1997).

Para la caracterización macroscópica se tomaron discos de 5 mm de diámetro de los diferentes aislamientos y se colocaron en placas Petri (90 mm) que contenían SDA, incubándose en oscuridad continua a 25 °C. A los 10 días se midió el crecimiento radial de las colonias y se anotaron las siguientes características culturales: aspecto, color de ambas superficies de la colonia, borde y velocidad de crecimiento.

En el caso de la caracterización microscópica, se realizaron microcultivos sobre portaobjetos con agar agua al 2%, observándose a las 48 y 72 horas, con la ayuda de un microscopio binocular (aumento 900x), la morfología y disposición de las células conidiógenas y de los conidios. Los aislamientos se identificaron mediante las claves y descripciones de géneros y especies hechas por Samson *et al.* (1988) y Humber (1997).

Resultados y discusión

A partir de las muestras de suelo y de insectos se obtuvieron 52 aislamientos fungosos, los cuales fueron numerados en orden consecutivo, según aparecieron, desde el X-001 hasta el X-052.

Al aplicarse las pruebas de patogenicidad sobre *B. magna*, o comprobarse los postulados de Koch cuando procedió, solo ocho de los aislamientos resultaron patogénicos al locústido: X-003, X-017, X-023, X-024, X-031, X-036, X-040 y X-042.

Los aislamientos seleccionados por su patogenicidad a *B. magna* mostraron las características morfológicas, macroscópicas y microscópicas que se describen a continuación:

En el caso de los aislamientos denominados X-003, X-023, X-024, X-036 y X-042 sobre el insecto hospedante infectado (*G. mellonella*), de forma general, el micelio emerge del exoesqueleto formando una cubierta

densa de color blanco sobre la superficie, apreciándose la formación de sinemas. Con el tiempo se torna de color crema y aspecto polvoriento.

Al ser cultivado sobre SDA, el hongo creció relativamente rápido, de 3.6 a 3.8 cm en 10 días, formando colonias elevadas, de micelio compacto, circulares, bordes regulares y de color blanco que con la edad se tornaron cremosas y polvorientas, con el reverso de un color amarillo pálido (figura 3).

En los microcultivos se observaron abundantes conidióforos, de los cuales emergían grupos de células conidiógenas (fiálides) de base globosa y forma de frasco, terminadas en zig-zag, sobre las cuales se insertan conidios globosos o subglobosos, unicelulares e hialinos.

Las anteriores características son muy similares para todos los aislamientos, y coinciden con lo señalado en las descripciones y claves de Samson *et al.* (1988) y Humber (1997) para la especie *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, cuyo teleomorfo es *Cordyceps bassiana* (Sung *et al.*, 2007). Los aislamientos fueron denominados como: Bb-001 (X-003), Bb-002 (X-023), Bb-003 (X-024), Bb-004 (X-036) y Bb-005 (X-042).



Figura 3. Colonia de *B. bassiana* en SDA.

Los aislamientos X-017, X-031 y X-040, sobre la cutícula de los insectos infectados desarrollaron un micelio profuso, semejante a una costra, de color blanco, que con el proceso de esporulación se tornó de color verde oliváceo.

Las colonias sobre SDA se caracterizaron por un crecimiento rápido, de 5.8 a 6.2 cm en 10 días, de forma circular con bordes regulares, micelio poco profuso, formando anillos concéntricos que se tornan verde

oliváceos según avanza el proceso de esporulación, manteniéndose la zona de crecimiento de color blanco. El reverso de la colonia es de una tonalidad amarillenta (figura 4).

Las anteriores características son muy similares para todos los aislamientos, y coinciden con lo señalado en las descripciones y claves de Samson *et al.* (1988) y Humber (1997, 1998) para la especie *Metarhizium anisopliae* Sorokin, cuyo teleomorfo es *Metacordyceps taii* (Sung *et al.*, 2007). Los aislamientos fueron denominados como Ma-001 (X-017), Ma-002 (X-31) y Ma-003 (X-040).

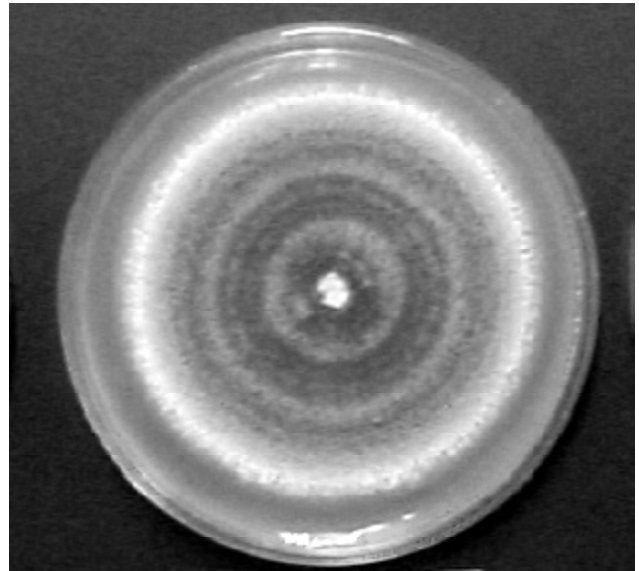


Figura 4. Colonia de *M. anisopliae* en SDA.

En la figura 5 se muestran los ocho aislamientos fúngicos seleccionados por su carácter patógeno sobre *B. magna*, los cuales se presentan en el cuadro 1, indicando su procedencia.

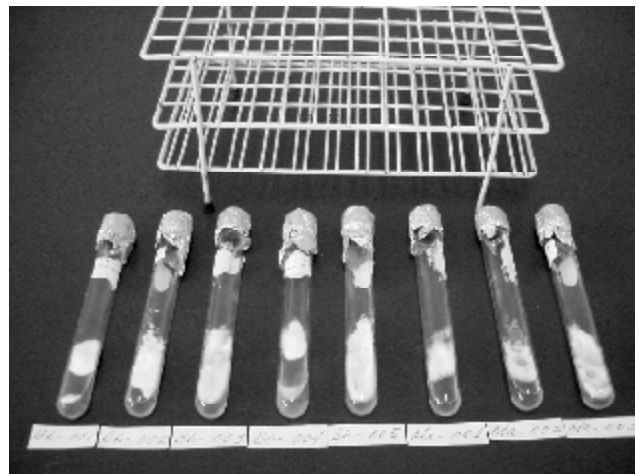


Figura 5. Aislamientos patógenos a *B. magna*, obtenidos en los muestreos.

Cuadro 1. Aislamientos fúngicos patogénicos a *B. magna* obtenidos en el estado de Chihuahua, México.

Aislamiento	Especie	Aislado de	Lugar
Bb-001	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Brachystola magna</i>	General Trías
Bb-002	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo	Orranteño
Bb-003	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo	Delicias
Bb-004	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo	Las Varas
Bb-005	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo	Alvareñas
Ma-001	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Suelo	Orranteño
Ma-002	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Suelo	Santa Gertrudis
Ma-003	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Suelo	Las Varas

Sun y Liu (2008) y Sun *et al.* (2008) han señalado que el suelo juega un importante papel como reservorio de hongos entomopatógenos, y que de ellos, *B. bassiana* y *M. anisopliae* están entre los más comunes. Agregan que el conocimiento de la composición y distribución de hongos entomopatógenos indígenas es esencial para evaluar el potencial de control biológico de estos hongos en un agroecosistema específico.

Quesada *et al.* (2007), han señalado el carácter cosmopolita de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y reportan sus resultados sobre la distribución de los mismos en el suelo, indicando que un alto porcentaje de las muestras evaluadas resultó positivo para ambas especies.

Milner y Hunter (2001) señalan a estas especies como buenos agentes de control-biológico de locústidos en Australia, mientras que Copping (2004) también se refiere a las mismas como importantes agentes de control biológico de organismos nocivos, entre ellos los locústidos, además de ser muy seguros desde el punto de vista ambiental. Consideraciones similares han sido realizadas por Castrillo *et al.* (2005) cuando se refieren a la importancia de *M. anisopliae* como agente de control biológico de locústidos en África.

Por su parte, M. Entz *et al.* (2005) han señalado que *M. anisopliae* es un hongo reconocido como patógeno de locústidos y saltamontes, y que tradicionalmente se han utilizado en su identificación sus características de desarrollo sobre medios de cultivo, el examen microscópico de esporas y estructuras asociadas, así como bioensayos con insectos susceptibles.

Los resultados de este trabajo demuestran que en las condiciones naturales de la región frijolera del estado de Chihuahua es posible obtener aislamientos de hongos de las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* patogénicos a *B. magna*, lo que constituye el primer reporte de este tipo para estas condiciones.

Conclusión

Bajo las condiciones naturales y sistemas de producción de la zona temporalera del estado de Chihuahua, México, se obtuvieron aislamientos nativos de hongos entomopatógenos de las especies *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* Sorokin, patogénicos a *Brachystola magna* Girard, lo cual constituye el primer reporte de este tipo para este estado mexicano.

Referencias

- CAB INTERNATIONAL: *Crop Protection Compendium*, Wallingford, UK, 2006.
- CARRILLO, S.J.: "Evolución del control biológico de insectos en México", *Folia Entomológica Mexicana*, 65, 1985, pp. 139-146.
- CESAVECH: *Campaña 2008 contra el chapulín frijolero*, Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Chihuahua, Chihuahua, México, 2009.
- COPPING, L.G.: *The Manual of Biocontrol Agents*, 3a. ed., British Crop Protection Council, Aston, UK, 2004.
- ENTZ, S.C.; JOHNSON, D.L. y KAWCHUK, L.M.: "Development of a PCR-based Diagnostic Assay for the Specific Detection of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*", *Mycological Research*, 109(11), 2005, pp. 1302-1312.
- GOETTEL, M.S. e INGLIS, G.D.: "Fungi: Hyphomycetes", en: LACEY, L.A. (ed.): *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, Nueva York, 1997.
- HUMBER, R.A.: "Fungi: Identification", en: LACEY, L.A. (ed.): *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, Nueva York, 1997.
- MACIEL, D. y CASILLAS, A.: *Chihuahua, monografía estatal*, 3a. ed., SEBN-SEP, México, 241, 1994, pp. 14-19.
- MILNER, J.R. y HUNTER, D.M.: "Recent Developments in the Use of Fungi as Biopesticides Against Locusts and Grasshoppers in Australia", *Journal of Orthoptera Research*, 10, 2001, pp. 271-276.
- QUESADA, M.E.; NAVAS, C.J.; MARANHÃO, E.A.; ORTIZ, U.A. y SANTIAGO, A.C.: 2007. "Factors Affecting the Occurrence and Distribution of Entomopathogenic Fungi in Natural and Cultivated Soils", *Mycological Research*, 111, 2007, pp. 947-966.
- SAMSON, R.A.; EVANS, H.C. y LATGÉ, J.P.: *Atlas of Entomopathogenic Fungi*, Springer-Verlag, Berlín, 1988.
- SUN, B.D. y LIU, X.Z.: "Occurrence and Diversity of Insect-associated Fungi in Natural Soils in China", *Applied Soil Ecology*, 39(1), 2008, pp. 100-108.
- SUN, B.D.; YU, H.; CHEN, A.J. y LIU, J.Z.: "Insect-associated Fungi in Soils of Field Crops and Orchards", *Crop Protection*, 27, 2008, pp. 1421-1426.
- SUNG, G.H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA, J.J.; SHRESTHA, B. y SPATAFORA, J.W.: "Phylogenetic Classification of Cordyceps and the Clavicipitaceous Fungi", *Studies in Mycology*, 57(1), 2007, pp. 5-59.
- USDA: "Plains Lubber Grasshopper *Brachystola magna* (Girard)", *Species Fact Sheet*, boletín 912, Wyoming Agricultural Experiment Station, USDA-ARS, 1999. 