

Efecto del extracto crudo de *Beauveria bassiana* sobre las poblaciones bacterianas de la rizosfera del cultivo de caña de azúcar

Erika Chávez Ibañez,¹ Aida Hamdan Partida,² Juan Esteban Barranco Florido,³ Silvia Rodríguez Navarro,⁴ Jaime Bustos Martínez² y Víctor Hugo Marín Cruz⁵

Resumen. Suelo de caña de azúcar fue expuesto a conidios y extractos de *Beauveria bassiana*, así como al insecticida sistémico Furadan[®] para evaluar su efecto en la rizosfera del suelo. Los cambios en la diversidad de poblaciones microbianas del suelo fueron analizados por DGGE. Los conidios de *B. bassiana* no tienen ningún efecto en la comunidad microbiana, los extractos crudos y la fracción mayor a 10 kDa disminuyeron la diversidad microbiana y con la fracción menor a 10 kDa se redujo más la diversidad, debido a que está constituida por moléculas con actividad antimicrobiana, insecticida y acaricida, sin embargo, los resultados más significativos se obtuvieron con el Furadan[®], ya que tiene un mayor efecto en la composición microbiana, disminuyéndola drásticamente. Las biomoléculas con actividad insecticida de *Beauveria bassiana* modifican la microbiota con menor impacto respecto al Furadan[®] y proporcionan nuevas líneas de investigación para disminuir la aplicación de insecticidas al suelo; utilizados para el control de plagas rizófagas de importancia agrícola.

Palabras clave: Rizosfera, Extracto crudo, *Beauveria bassiana*, Poblaciones bacterias.

¹ Maestría de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad-Xochimilco.

² Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad-Xochimilco.

³ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad-Xochimilco.

⁴ Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad-Xochimilco, e-mail: srodnararro@gmail.com

⁵ Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad-Xochimilco.

Abstract. Sugar cane soil was exposed to conidia and extracts of *Beauveria bassiana*, as well as to the systemic insecticide Furadan® to assess their effect on the rhizosphere. Changes in diversity of the soil's microbial populations were analyzed using DGGE. *B. bassiana* conidia have no effect on the microbial community, crude extracts and the fraction above 10 kDa reduced the microbial diversity, whereas with the fraction under 10 kDa the diversity dropped even more, since it comprises molecules with antimicrobial, insecticidal and anti-mite activities. Nonetheless, the most significant results were obtained with Furadan®, which has a greater effect on the microbial composition, reducing it drastically. *B. bassiana* biomolecules with insecticidal activity do modify the microbiota with a lesser impact compared to Furadan® and provide new research lines to moderate the use of insecticides in the soil, with the aim of controlling agriculturally important root-eating pests.

Keywords: Rhizosphere, Crude extract, *Beauveria bassiana*, Bacteria populations.

INTRODUCCIÓN

En México, la producción de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.; Poaceae) es de gran importancia económica; se reporta una superficie cosechada de 767 mil 231 hectáreas y un volumen industrializado de caña molida bruta de 56 millones de toneladas (SIAP, 2017) que generan 440 mil empleos directos y 2.5 millones de empleos indirectos (Mejía *et al.*, 2010). En el estado de Morelos se produce 2 090 722 toneladas de caña de azúcar (INEGI, 2017), siendo uno de los factores limitantes para su desarrollo la proliferación de plagas, como las larvas de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae), que generan daños y una disminución del rendimiento entre 20 y 40%, en diversas regiones agrícolas de México (Chavez *et al.*, 2014).

En Morelos se aplican insecticidas como el Furadan® para reducir su población, la que ha venido ocasionado daños a la salud humana y al ambiente (Aragón *et al.*, 2012). Por tal motivo surge la necesidad de utilizar hongos entomopatógenos, que reducen las poblaciones de plagas (González *et al.*, 2012). *Beauveria bassiana* es un hongo filamentoso que produce metabolitos secundarios, generalmente son depsipéptidos cíclicos de bajo peso molecular como: beauvericina, beauverólido y basianólido, que tienen actividades antibacterianas, antifúngicas, citotóxicos, insecticidas, acaricidas y nematocidas (Wang *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2010; Arboleda *et al.*, 2011); poseen baja toxicidad en humanos y no necesitan requerimientos especiales para su empleo. Estas biomoléculas contienen alto potencial de acción insecticida y pueden ser una alternativa para el control de plagas y con ello evitar el uso de agroquímicos sistémicos.

La rizosfera es la fase del suelo en la que los minerales y los microorganismos se encuentran en estrecha relación con las raíces de las plantas, desempeñan funciones de procesos de edafogénesis, ciclos biogeoquímicos, fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos y degradación de compuestos xenobióticos (Chaudhry *et al.*, 2012). Las poblaciones microbianas de la rizosfera lo constituyen grupos de bacterias (dominio Bacteria), arqueas (dominio Arquea), hongos, microalgas y protozoarios (dominio Eukarya); estos grupos representan 90% del total de la microbiota del suelo, y otro 10% lo constituyen la microfauna (nematodos y artrópodos).

Estos microorganismos desempeñan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos, así como el reciclamiento de compuestos orgánicos, también contribuyen en la nutrición y salud de la planta, la estructura y fertilidad del suelo. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto que tendrían los insecticidas sistémicos en la rizosfera y de los metabolitos de *B. bassiana* con actividad insecticida y potencial actividad antibiótica que pueden afectar potencialmente la diversidad microbiana de la rizosfera, también se desconoce cómo pueden influir en los ecosistemas subterráneos (Kirk *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008). Recientemente, proyectos de análisis de metagenomas de procariotas y eucariotas muestran todas las poblaciones microbianas que se encuentran en este entorno (Hayat *et al.*, 2010) y que permiten evaluar el impacto ambiental de metabolitos con actividad insecticida. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de los metabolitos y enzimas del extracto crudo de *B. bassiana* sobre la comunidad microbiana de la rizosfera de un cultivo de caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras de la rizosfera de caña de azúcar

El 4 de abril de 2013, se obtuvieron 3 muestras del suelo de la rizosfera de caña de azúcar de tres campos cañeros del municipio de Zacatepec, Morelos, localizado al norte 18° 41', al sur 18° 37' de latitud norte; Al este 99° 11', al oeste 99° 14' de longitud oeste, A una altura media de 910 msnm: M1 Campo Jojutla, localizado 98° 59' 33.13" O, 18° 6' 52.13" N; M2 Campo San Juanes, localizado 99° 14' 23.02" O, 18° 3' 35.13" N y M3 Campo Puente de Ixtla, localizado 99° 0' 2.79" O, 18° 6' 52.13" N (Plan Municipal de Desarrollo Zacatepec 2009-2012). Estas muestras se utilizaron para la estandarización del método de extracción de ADN. Se realizaron cuadrantes de 50x50 cm y 30 cm de profundidad; el suelo fue colectado en bolsas herméticas nuevas de aproximadamente 100 g, y se trasladaron

en hieleras a la UAM-Xochimilco. Para la evaluación de la comunidad microbiana de la rizosfera se utilizó el suelo del Puente de Ixtla, Morelos.

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se utilizó el aislado 11 de *Beauveria bassiana* y se mantuvo en agar dextrosa papa, a 28° C por 10 días. El cultivo sólido se realizó en matraces Erlenmeyer usando como soporte bagazo de caña, medio de sales y caparazón de camarón. Las condiciones del cultivo sólido fueron: humedad inicial 75%, pH 5 y temperatura de 25°C. La inoculación fue con 1×10^8 conidios (g Peso húmedo)⁻¹ (Barranco *et al.*, 2009).

Obtención de conidios y extracto crudo

A cada matraz se agregó 50 mL de Tween 80 al 0.05%, y se agitó por 5 minutos; la cantidad de conidios se determinó en una cámara de Neubauer. Para la obtención del extracto crudo después de 15 días, se pesó el contenido y se agregó agua porción 1:1 (p:v), se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C y se filtró con una membrana de nitrocelulosa de corte de 10kDa y se mantuvieron en refrigeración a 4°C (Chávez *et. al.*, 2014).

1. Estandarización de la técnica de extracción del ADN y amplificación del gen 16S del ARNr de la rizosfera de caña de azúcar

Para la extracción del ADN se utilizaron 600 mg de suelo sin tamizar y suelo tamizado con las técnicas de Sonicación-Fenol-Cloroformo y Bead-Beater-Fenol-Cloroformo propuesto por Hamdan (2004) y dos equipos comerciales IQEXT-Silica, Nucleic Acid Extraction (GeneReach Biotechnology Corp.) y Fast ID Genomics DNA Extraction (Genetic ID), de acuerdo con los protocolos proporcionados por los fabricantes.

2. Cuantificación de ADN

Se determinó la concentración de ácidos nucleicos, proteínas y ácidos húmicos en un NanoDrop 2000 Thermo Scientific®. Se ajustó utilizando agua destilada como blanco. Se midió la absorbancia de los ácidos nucleicos a 260 nm, las proteínas a 280 nm y los ácidos

húmicos a 230 nm. Una unidad de absorbancia es equivalente a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ADN (Shan *et al.*, 2008). Los coeficientes de las absorbancias permiten evaluar la presencia de proteínas a 260 / 280, de ácidos húmicos y otros contaminantes 260 / 230.

3. Amplificación por PCR para la región V6-V8 del gen 16S del ARNr

Para la amplificación del gen 16S del ARNr se utilizaron los siguientes iniciadores: 8 for 5'-AGACTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1492 rev 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'. Para la región V6-V8 se utilizaron los iniciadores: GC968 for 5'-CGCCCGGGGCGCGCCC-CGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTTACC-3' y UNI1401 rev 5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3' (Muyzer *et. al.*, 1993).

La mezcla de la reacción contiene: 1X amortiguador 10X, 400 ng/ μL albúmina sérica bovina, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM de dNTP's, 10 pmol/reacción iniciador GC968for, 10 pmol/reacción, iniciador UNI 1401rev, 1 U/ μL *Taq* polimerasa y 0.25 μg de ADN por muestra. El termociclador BioRad® fue utilizado bajo las siguientes condiciones: pre-desnaturalización 94°C por 5 min, desnaturalización 94°C por 30 s, alineación 55 °C por 20 s, elongación 72°C por 40 s 35 ciclos del paso 2 al 4 y post-elongación 72 °C por 7 min. Los productos de la amplificación por PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X, con bromuro de etidio en un transiluminador BioRad®.

4. Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalizante

Se preparó un gel al 8% de acrilamida /Bis 37:5:1 (2.6% C) (BioRad®) en buffer TAE 1X con un gradiente desnaturalizante paralelo de 30 a 60%, el equipo del DGGE fue BioRad®, DCode® (Universal Mutational Detection System). Nota: las soluciones de acrilamida/Bis se prepararon en tubos separados con un volumen de 20 mL⁻¹. Para el tubo del 30% se colocó 4 mL⁻¹ de acrilamina/Bis al 40%, 0.4 mL⁻¹ de buffer TAE 50X, 2.4 mL⁻¹ de formamida, 2.52 g de urea, 10.68 mL⁻¹ de agua destilada. El tubo al 60% contenía 4 mL⁻¹ de buffer TAE 50X, 4.8 mL⁻¹ de formamida, 5.04 g de urea, 5.36 mL⁻¹ de agua destilada y 0.4 mL⁻¹ de DCode Dye Solution. Se añadió el persulfato de amonio a una concentración final de 0.75% (v/v) (150 μL^{-1} /20 mL⁻¹) y el TEMED al 0.1% (v/v) (20 μL^{-1} /20 mL⁻¹). Se corrió el gel a las siguientes condiciones: Amortiguador TAE 1X, temperatura del buffer: 60°C, voltaje y tiempo de corrida: 200 V por 5 minutos y posterior a 85 V por 16 horas, se conectó la fuente de poder Power Pac 300, BioRad®.

5. Evaluación de la dinámica de la rizosfera de la caña de azúcar por conidios y metabolitos de *Beauveria bassiana*

Para evaluar el efecto de conidios y metabolitos del cultivo de *B. bassiana* sobre la dinámica poblacional de la rizosfera del suelo de Puente de Ixtla, Morelos, a los 7 días y 15 días; en cada unidad experimental se colocó 150 g; los tratamientos fueron: T1, Suelo control (agua destilada); T2, Suelo con conidios ($1 \times 10^7 / \text{mL}^{-1}$); T3, Suelo con extracto crudo, con peso molecular menor a 10kDa; T4, Suelo con extracto crudo con peso molecular mayor a 10kDa; T5, Suelo con extracto crudo y T6; Suelo con Furadan® (0.2 ml en 100 ml agua). Se aplicaron 8 ml de cada tratamiento, con tres repeticiones, posteriormente se colocaron en una cámara bioclimática Lumistel® a 25 °C y 50% de humedad.

6. Análisis de la dinámica de poblaciones bacterianas

Para el análisis de la dinámica de poblaciones bacterianas de la rizosfera de caña de azúcar se utilizaron los Software: GeneTools Versión 3.07 de SynGen UK y GeneDirectory Versión 1.02 de SynGen UK.

RESULTADOS

1-2. Estandarización de la técnica de extracción del ADN y amplificación del gen 16S del ARNr de la rizosfera de caña de azúcar y cuantificación del ADN

La tabla 1 muestra el ADN aislado de muestras de la rizosfera con las diferentes técnicas de extracción. Se utilizaron equipos comerciales y Sonicación-Fenol-Cloroformo. Los métodos Fast ID y IQEXT-Silica, Nucleic Acid Extraction fueron los procedimientos que tuvieron las concentraciones más bajas de ADN extraído, que corresponden a 11.9 y 22.3 ng μL^{-1} , respectivamente. Mientras que en el método Bead-Beater-Fenol-Cloroformo se obtuvo una concentración de 43.5 ng μL^{-1} , y la concentración más alta de DNA fue con el método Sonicación-Fenol-Cloroformo (207.3 ng μL^{-1}). Sin embargo, todas las muestras presentan contaminantes, principalmente de ácidos húmicos que interfieren en las reacciones de amplificación del gen. Respecto al coeficiente 260 / ADN 230, los métodos Bead-Beater-Fenol-Cloroformo y Fast ID Genomics DNA Extraction tuvieron valores menores a 2, lo que indica la presencia de contaminantes de ácidos húmicos. Mientras que el método Sonicación-

Fenol-Cloroformo mostraron valores mayores a 2.2. En relación del coeficiente A260 / A280, que corresponde a la pureza del ADN, todos los métodos de extracción presentaron valores menores a 1.8, que es indicativo de la presencia de proteínas en las muestras.

Tabla 1. Concentración y pureza del ADN con cuatro métodos de extracción

Método de extracción	Concentración de ADN ng μ L ⁻¹	Coeficiente 260/230	Coeficiente 260/280
Bead Beater-Fenol-Cloroformo	43.5	1.80	0.07
Sonicación -Fenol-Cloroformo	207.3	2.30	0.75
Fast ID Genomics DNA Extraction	11.9	1.95	0.19
IQEXT-Silica, Nucleic Acid Extraction	22.3	-----	-----

3. Amplificación por PCR para la región V6-V8 del gen 16S del ARNr

Para la amplificación de la región V6-V8 del gen 16S del ARNr se utilizaron los ADN de los métodos de extracción: Bead-Beater-Fenol-Cloroformo, IQEXT-Silica, Nucleic Acid Extraction y Sonicación-Fenol-Cloroformo. No se amplificó la región V6-V8 del gen 16S del ARNr, con los métodos IQEXT-Silica, Nucleic Acid Extraction y Sonicación-Fenol-Cloroformo debido a que con estos métodos arrastran muchos compuestos que interfieren en la amplificación por PCR, principalmente proteínas y ácidos húmicos. Mientras que con el método de extracción Bead-Beater-Fenol-Cloroformo se obtuvo una ampliación de 433 pb, como se observa en la Figura 1.

Figura 1. Amplificación de la región V6-V8 del gen 16S ARNr de las muestras de suelo con diferentes métodos de extracción de ADN

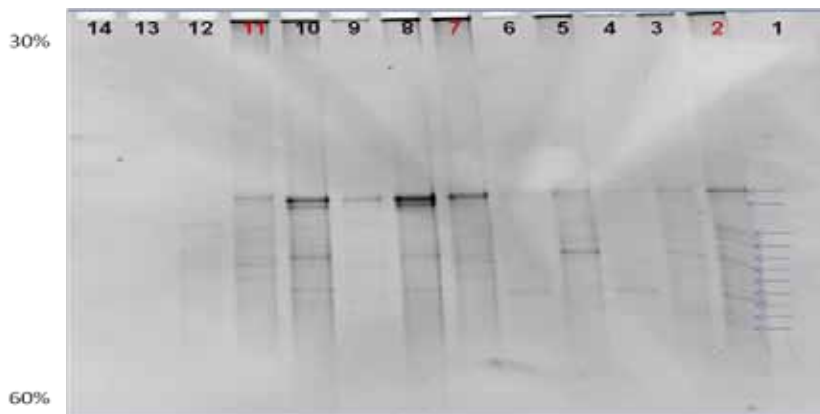


Carril 1: Marcador 100 pb, Carril 2: M1 campo Jojutla, Carril 3: M2 campo San Juanes, Carril 4: M3 campo Puente de Ixtla, Carril 5: M1 Jojutla, Carril 6: M2 campo San Juanes, Carril 7: M3 campo Puente de Ixtla, Carril 8: M1 campo Jojutla, Carril 9: M2 campo San Juanes, Carril 10: M3 campo Puente de Ixtla, Carril 11: Control positivo (cepa Control), Carril 12: Control negativo (control de reactivos).

4. Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalizante

Los productos de la amplificación el gen 16S del ARNr de la región V6-V8 se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8% con un gradiente de desnaturalizante del 30-60%, se observó un perfil de bandeos que corresponde a los amplicones de la región V6-V8 de la dinámica de poblaciones presentes en la rizosfera después de los métodos de extracción del ADN. Los mejores resultados se presentan al utilizar el método de Bead-Beater-Fenol-Cloroformo, que corresponden a los carriles 2, 7 y 11, observándose una mayor densidad poblacional bacteriana de la rizosfera de caña de azúcar, ya que se detectaron 12 poblaciones predominantes diferentes de bacterias. Mientras que con los métodos de los equipos comerciales Fast ID Genomics DNA Extraction y IQEXT-Silica, Nucleic Acid Extraction, se observaron 10 poblaciones y pocas poblaciones bacterianas, respectivamente (Figura 2).

Figura 2. Perfiles genómicos de comunidades microbianas del gen 16S del RNAr, del suelo de Puente de Ixtla con diferentes metodos de extracción de ADN (DGGE al 30-60%)



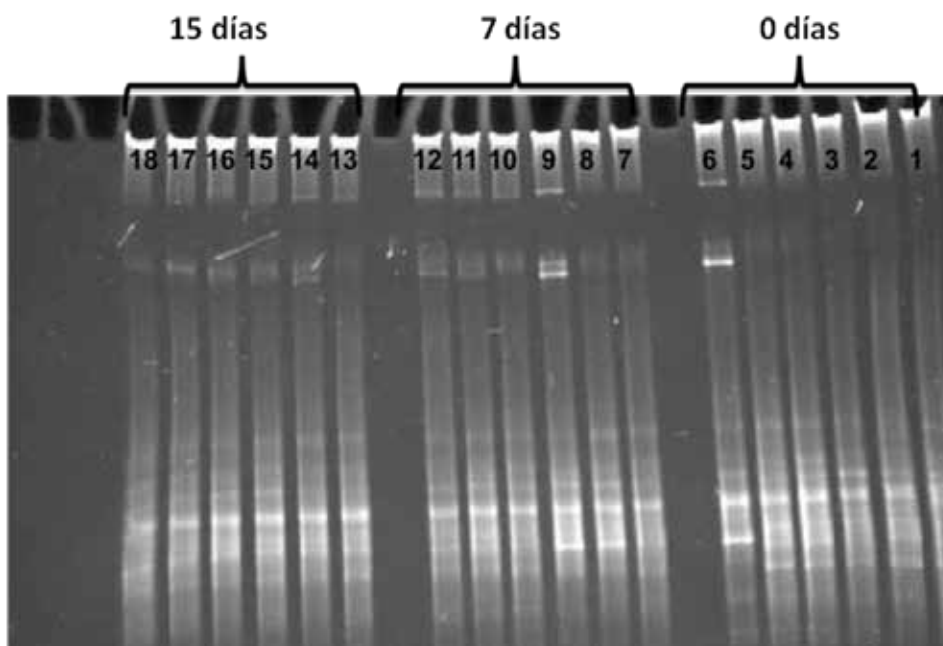
Carril 1: Control negativo; Carril 2: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método Bead-Beater-Fenol-Cloroformo; Carril 3: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método Fast ID Genomics DNA Extraction; Carril 4: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método Fast ID Genomics DNA Extraction; Carril 5: ADN obtenido de una muestra de suelo por método Fast ID Genomics DNA Extraction; Carril 6: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método IQEXT-Silica, Nucleic Acid Extraction; Carril 7: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método Bead-Beater-Fenol-Cloroformo; Carril 8: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método Fast ID Genomics DNA Extraction; Carril 9: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método Fast ID Genomics DNA Extraction; Carril 10: DNA obtenido de una muestra de suelo por el método Fast ID Genomics DNA Extraction; Carril 11: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método Bead-Beater-Fenol-Cloroformo; Carril 12: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método Fast ID Genomics DNA Extraction; Carril 13: ADN obtenido de una muestra de suelo por el método IQEXT-Silica, Nucleic Acid Extraction; Carril 14:Control negativo.

5. Evaluación de la dinámica de la rizosfera de la caña de azúcar por conidios y metabolitos de *Beauveria bassiana*

En el bioensayo, al tiempo inicial se observaron alrededor de 10 poblaciones en todos los tratamientos (Figura 3, carriles 1 al 6). A los siete y quince días en los tratamientos control y conidios, el número de poblaciones fueron entre 9 y 10 (carriles 7, 8, 13 y 14); cuando se aplicó el extracto crudo de *B. bassiana*, así como el extracto correspondiente a la fracción mayor a 10 kDa, se observó una disminución del número de poblaciones microbianas a

siete; la similitud de las mismas varió, como se muestra en la Figura 3, carriles 9, 11, 15 y 17. Con la aplicación del extracto de *B. bassiana*, correspondiente a la fracción que tiene un peso molecular menor a 10 kDa, disminuyeron el número de poblaciones de bacterias a seis (Fig. 3 carriles 10 y 16). Finalmente, con la aplicación del Furadan® el número de poblaciones se reduce a tres (Figura 3 carriles 12 y 18).

Figura 3. Perfiles genómicos de comunidades bacterianas con diferentes tratamientos sobre el suelo de la rizosfera de Puente de Ixtla, Morelos (DGGE al 30-60%)



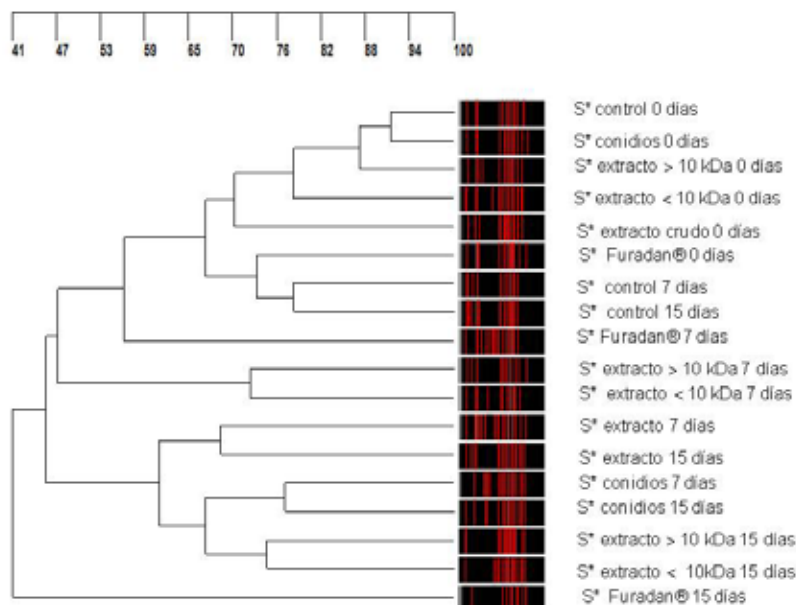
Carril 1: Suelo control sin tratamiento; Carril 2: Suelo con conidios de *B. bassiana*; Carril 3: Suelo con extracto de *B. bassiana* de peso molecular menor a 10kDa; Carril 4: Suelo con extracto de *B. bassiana* de peso molecular mayor a 10kDa; Carril 5: Suelo con extracto de *B. bassiana* filtrado con membrana millipore 045 μ m; Carril 6: Suelo con Furadan®, Carril 7: Suelo control, Carril 8: Suelo con conidios de *B. bassiana*, Carril 9: Suelo con extracto de *B. bassiana* de peso molecular menor a 10kDa; Carril 10: Suelo con extracto de *B. bassiana* con peso molecular mayor a 10kDa; Carril 11: Suelo con extracto de *B. bassiana* filtrado con membrana millipore 045 μ m; Carril 12: Suelo con Furadan®; Carril 13: Suelo control; Carril 14: Suelo con conidios de *B. bassiana*; Carril 15: Suelo con extracto de *B. bassiana* con peso molecular menor a 10kDa; Carril 16: Suelo con extracto de *B. bassiana* con peso molecular mayor a 10kDa; Carril 17: Suelo con extracto de *B. bassiana* filtrado con membrana millipore 045 μ m; Carril 18: Suelo con Furadan®.

6. Análisis de la dinámica de poblaciones bacterianas

En este bioensayo, a los 7 y 15 días se muestra que las poblaciones bacterianas de los suelos controles tienen una similitud de 90%. Al aplicar los conidios de *B. bassiana* presentan una similitud de 86%, mientras que para los extractos crudos de *B. bassiana* la similitud fue de 66%, y para el Furadan® de 57%; las poblaciones bacterianas se modificaron y sólo se localizaron tres poblaciones (Figura 4), de igual manera esto se muestra con el análisis en el DGGE.

En el metagenoma de suelo control y del suelo con conidios no existen diferencias en el número de poblaciones, con un porcentaje de identidad de 100%, aunque sí hay diferencias en el suelo con Furadan®, con un porcentaje de identidad de 88% y suelo tratado con los diversos extractos crudos de *B. bassiana* con 81 por ciento.

Figura 4. Dendrograma del análisis de las poblaciones bacterianas con diferentes tratamientos del suelo de la rizosfera de la caña de azúcar de Puente de Ixtla



Tiempo 0 (inicial) y después de 7 y 15 días de aplicación de los tratamientos. S*=suelo.

DISCUSIÓN

El suelo de la caña de azúcar del sitio de Puente de Ixtla, Morelos, México, está constituido por ácidos húmicos y otros compuestos que afectan el rendimiento de los ácidos nucleicos, así como de su pureza. El mejor método de extracción fue el de Bead Beater-Fenol-Cloroformo, en el que se obtuvo un mayor rendimiento y una mejor remoción de ácidos húmicos (260 / 230) y proteínas (260 / 280) (Tabla 1.); Shan *et al.* (2008) reportan que el mejor protocolo de extracción del ADN para los lodos activos es utilizando el buffer TENP, más 1.8% de SDS con choque térmico porque logran un alto rendimiento de ADN total. Moulas *et al.* (2013) utilizaron el método de extracción del ADN para la filosfera por sonicación, utilizando fosfato de sodio como buffer y un equipo comercial (Macherey-Nagel, Germany).

Para el T1 mostró mayor diversidad microbiana (carril 1), mientras que con la aplicación con conidios de *Beauveria bassiana* (carril 2) no modificó la diversidad bacteriana debido a que en la rizosfera de caña de azúcar intervienen hongos y otros microorganismos, por lo tanto los conidios no pueden perturbar esta diversidad (Figura 3.). Berendsen *et al.* (2012) mencionaron que la rizosfera es la zona estrecha de tierra que se ve influenciada por las secreciones de las raíces, puede contener hasta 1.011 células microbianas de raíz por gramo y más de 30 000 especies procariotas.

Respecto a las poblaciones microbianas de la rizosfera del suelo de caña de azúcar, la aplicación de conidios no afecta a las poblaciones microbianas de la rizosfera y además *B. bassiana* brinda protección a la planta (Berendsen *et al.*, 2012). Respecto a la aplicación de la fracción del extracto con un peso molecular a 10kDa, el número de bandas disminuye debido a que en ese extracto se encuentran depsipéptidos con propiedades antibióticas (Figura 3 y 4) (Xu *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2010).

El impacto que tiene el Furadan® sobre las poblaciones microbianas es similar a lo reportado por Moulas *et al.* (2013) (Figura 3-4) al realizar un análisis poblacional por DGGE del suelo y follaje después de la aplicación de dos insecticidas sistémicos Imidacloprid y Metalaxyl, ambos insecticidas produjeron cambios en las comunidades fúngicas y bacterianas. Mientras que González *et al.* (2012) han mencionado que los insecticidas sistémicos afectan a la microbiota de la rizosfera de la caña de azúcar. Semejantes cambios se observan en comunidades microbianas de los sedimentos cuando se les aplican glifosato, pirimicarb e isoproturón (Widenfalk *et al.*, 2008).

CONCLUSIÓN

El mejor método de extracción del DNA de la rizosfera de caña de azúcar es del Mini Bead-Beater-fenol-cloroformo y la *Taq*-polimeras Flexi (promega).

Los depsipéptidos de *Beauveria bassiana*, con peso molecular menor a 10 kDa y con actividad insecticida, alteran la microbiota de la rizosfera de caña de azúcar con menor impacto respecto al Furadan® (carbamato).

Los metabolitos producidos por *B. bassiana* muestran que sí hay un efecto antibacteriano alterando la microbiota de la rizosfera del cultivo de la caña de azúcar, sin embargo, su efecto es menor que el ocasionado por el Furadan®, por lo tanto se concluye que los metabolitos pueden ser una mejor opción para el manejo de “gallina ciega” en el suelo del cultivo de caña de azúcar sin alterar significativamente las poblaciones bacterianas de la rizosfera.

BIBLIOGRAFÍA

- Aragón, A. *et al.*, 2012, “Fauna de Coleóptera Lamellicornia de la zona cañera del ingenio de Atencingo, Puebla, México”, en *Acta Zoológica Mexicana*, 28(1): 161-171.
- Arboleda, J. *et al.*, 2011, “Cytotoxic activity of fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: An intraspecific evaluation of Beauvericin production”, en *Current Microbiology*, 63: 306-312.
- Barranco, E. *et al.*, 2009, “ β -N-Acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanni* ATCC 26854 by soli-state fermetation utilizing shrimp shell”, en *Interciencia*, 34(5): 356-360.
- Berendsen, L. *et al.*, 2012, “The rhizosphere microbiome and plant health”, en *Trends in Plant Science*, 17(8): 478-486.
- Borges, D. *et al.*, 2010, “Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos”, en *ICIDCA Sobre los derivados de la caña de Azúcar*, 44: 49-55.
- Chaudhry, V. *et al.*, 2012, “Changes in Bacterial Community Structure of Agricultural Land Due to Long-Term Organic and Chemical Amendments”, en *Microbial Ecology*, 64(2): 450-460.
- Chávez, E. *et al.*, 2014, “Actividad insecticida *in vitro* de extracto crudo de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre larvas de *Phyllophaga* spp. (Harris)”, en *Revista de Protección Vegetal*, 29(3): 226-230.

- González, M. *et al.*, 2012, "Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: Retos y perspectivas", en *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8): 42-55.
- Hamdan, A., 2004, *Biomonitoreo: seguimiento de poblaciones microbianas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*, Tesis de Maestro en Biotecnología, UAM-Iztapalapa, México.
- Hayat, R. *et al.*, 2010, "Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review", en *Annals of Microbiology*, 60: 579-598.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2017, *Anuario estadístico y geografía de Morelos*, 2017, México.
- Kirk, L. *et al.*, 2004, "Methods of studying soil microbial diversity", en *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169-188.
- Mejía, E. *et al.*, 2010, *Estudio de caracterización de zonas potenciales de mecanización en las zonas de abasto cañeras*, Colegio de Postgraduados-Sagarpa, 2010, México.
- Moulas, C. *et al.*, 2013, "Effects of Systemic Pesticides Imidacloprid and Metalaxyl on the Phyllosphere of Pepper Plants", en *BioMed Research International*, 1-8.
- Muyzer, G. *et al.*, 1993, "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA", en *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 695-700.
- Plan Municipal de Desarrollo Zacatepec 2009-2012, en www.transparenciamorelos.mx/.../plan%20desarrollo%20mpal%20OCA, consultado el 10/10/2017.
- Shan, G. *et al.*, 2008, "Purification of total DNA extracted from activated sludge", en *Journal on Environmental Science*, 20: 80-87.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2017, información de las Delegaciones de la Sagarpa, en http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=208, consultado el 09/01/2017.
- Wang, L. *et al.*, 2005, "Effects of toxins from two strains of *V. lecanii* (Hypomycetes) on bioattributes of predatory ladybeetle, *Delphastus catalane* (Col. Coccinellidae)", en *Journal of Applied Entomology*, 129: 32-38.
- Widengalk, A. *et al.*, 2008, "Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes – responses at various levels of microbial community organization", en *Environmental Pollution*, 152(3): 576-584.
- Xu, Y. *et al.*, 2008, "Biosynthesis of the cycloligomer depsipeptide beauvericina virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*", en *Chemistry & Biology*, 15: 898-907.