

Inducción de la germinación de conidios de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y el micoparásito *Trichoderma harzianum*

Induction of conidia germination of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and the mycoparasite *Trichoderma harzianum*

Raúl Rodríguez-Guerra¹, Luis Fernando Armijo-Martínez², J. Isabel López-Arroyo^{1*}

¹Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 31 Carr. Montemorelos-China, CP 67400, General Terán, Nuevo León, México.

²Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 66450 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

Resumen

La germinación eficiente de conidios de hongos utilizados en el control biológico de artrópodos plaga y hongos fitopatógenos constituye una característica importante para asegurar su actividad como agente regulador de poblaciones de organismos objetivo. En esta investigación se evaluó la capacidad para germinar de conidios de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals-Criv.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, así como del micoparásito *Trichoderma harzianum* Rifai, con los tratamientos inductores de germinación extracto de levadura (0.5 %), el fertilizante Aminocel 500® (0.15 %), y en agua. De ocho cepas evaluadas (cuatro de *B. bassiana* y dos de *M. anisopliae* y *T. harzianum*, respectivamente), en el tratamiento testigo a base de agua se presentó el menor promedio de germinación de conidios (hasta 0 % en *T. harzianum* cepa Stgo A31); mientras que los valores máximos fueron encontrados en el extracto de levadura (99.7%), y con registros de hasta el 99.0 % en el fertilizante. De las tres especies, *T. harzianum* mostró los porcentajes más bajos de germinación en agua respecto a los otros hongos. Esta especie y *B. bassiana* mostraron valores similares tanto en extracto de levadura como con el fertilizante. En *M. anisopliae* la cepa 48-C registró un valor bajo de germinación en agua (42.5 %) y la cepa 12-19 con el fertilizante (48.0 %). Los

Abstract

The efficient germination of fungal conidia used in biological control of arthropod pests and phytopathogenic fungi constitutes an important characteristic to assert its activity as a regulating agent of target organism populations. In this investigation, we evaluated the conidia capacity to germinate of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals-Criv.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, as well as the mycoparasite *Trichoderma harzianum* Rifai, under the germination-inducing treatments yeast extract (0.5%), Aminocel 500® fertilizer (0.15%), and in water. Of eight strains tested (four from *B. bassiana* and two from *M. anisopliae* and *T. harzianum*, respectively), the water-based control treatment showed the lowest average germination of conidia (0% in *T. harzianum* strain Stgo A31); meanwhile, the maximum amounts were found in the yeast extract (99.7%), with records up to 99.0% conidia germination in the fertilizer. Of the three species, *T. harzianum* presented the lowest percentages of germination in water compared to the other fungi. This species and *B. bassiana* showed similar values of germination in yeast extract and in Aminocel 500®. In *M. anisopliae*, the 48-C strain reached low germination values in water (42.5%) and the 12-19 strain in the fertilizer (48.0 %). Overall results showed

resultados obtenidos demostraron que el fertilizante Aminocel 500® posee compatibilidad con hongos agentes de biocontrol de artrópodos plaga y de hongos fitopatógenos, favoreciendo la capacidad de los conidios para germinar, lo que constituye una ventaja adicional a su función y una posible forma económica de potenciar la actividad de estos agentes de control biológico de plagas.

Palabras clave: Fertilizantes, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Trichoderma*, biocontrol.

***Autor de correspondencia:**
lopez.jose@inifap.gob.mx

Introducción

La ocurrencia de plagas y fitopatógenos en la agricultura ha conducido al uso excesivo de plaguicidas para disminuir las pérdidas que causan (Ferron y Deguine, 2005). Debido al efecto negativo de estos productos sobre el ambiente, biodiversidad, salud y otros (Kibria, 2016; Geiger *et al.*, 2010; Bale *et al.*, 2007), en los últimos años se ha incrementado el uso de microorganismos para el biocontrol de plagas dañinas a la agricultura. En el control biológico de artrópodos perjudiciales y hongos fitopatógenos por hongos entomopatógenos y micoparásitos, respectivamente, estos agentes benéficos poseen la ventaja de representar inocuidad para el ambiente, ser inofensivos a animales y al hombre, y pueden persistir en los cultivos a través del tiempo, entre otras características positivamente sobresalientes (Sharma *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2012). El uso de agentes de biocontrol, y cualquier avance en estrategias que favorezcan su eficiencia, debe apoyar su utilización contra plagas y fitopatógenos para fortalecer la sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola (Tracy *et al.*, 2014; Bale *et al.*, 2007).

Los hongos entomopatógenos para poder ejercer de manera eficiente su acción

that the Aminocel 500® fertilizer has compatibility with fungal biocontrol agents of arthropod pests and phytopathogenic fungi, favoring the capacity of the conidia to germinate, which constitutes an additional advantage to its function and an economical way to enhance the activity of these agents of pest biological control.

Key words. Fertilizer, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Trichoderma*, biocontrol.

Introduction

Occurrence of arthropod pests and phytopathogens in agriculture has led to the excessive use of pesticides to reduce losses resulting from their attack (Ferron and Deguine, 2005). Due to their negative effects on the environment, biodiversity, health and others, the use of microorganisms for the biocontrol of these harmful organisms to agriculture has emerged as alternative to chemical control and it has increased in recent years (Kibria, 2016; Geiger *et al.*, 2010; Bale *et al.*, 2007). In the biological control of arthropod pests and fungi by entomopathogens and mycoparasites, respectively, these have the advantage of being safe for the environment, harmless to animals and man, and can persist in crops, among others positive characteristics (Sharma *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2012). The use of biocontrol agents, and any advance in strategies that favor their efficiency, should support their use against pests and phytopathogens to strengthen the sustainability of agricultural production systems (Tracy *et al.*, 2014; Bale *et al.*, 2007).

In order to efficiently exert the action as biocontrol agents against their target organisms, entomopathogenic fungi must germinate their conidia (Shahid *et al.*, 2012); in the case of mycoparasitic fungi, although they require chemotropism, recognition, adhesion

contra los organismos blanco, deben llevar a cabo la germinación de sus conidios (Shahid *et al.*, 2012); y aunque los hongos micoparásitos requieren de quimiotropismo, reconocimiento, adhesión y penetración de sus hospederos (Ram *et al.*, 2018), la germinación de los conidios es requerida para colonizar a los hongos fitopatógenos. La rapidez en este proceso es un factor importante que posibilita una mayor efectividad de los hongos entomopatógenos y micoparásitos para infectar a los organismos blanco. La germinación eficiente de los conidios es influenciada por condiciones de producción (Daryaei *et al.*, 2016; Mustafa y Kaur, 2009), formulación (Sy *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 1999), factores ambientales (Kaiser *et al.*, 2019; Kredics *et al.*, 2003; Walstad *et al.*, 1970) y diversos agroquímicos (Sain *et al.*, 2019; Abidin *et al.*, 2017; Majchrowska-Safaryan *et al.*, 2017; Mwamburi *et al.*, 2015; Shapiro-Ilan *et al.*, 2013), entre otros.

Dentro de la diversidad de agroquímicos que son aplicados a las plantas cultivadas, existen algunos asociados con efectos sobre los agentes de control biológico (Klingen y Haukeland, 2006). El extracto de levadura y el fertilizante Aminocel 500® han demostrado incrementar significativamente la germinación de conidios de hongos entomopatógenos respecto a otros fertilizantes (Ruiz-Amaro *et al.*, 2019); sin embargo, el uso práctico del primero es obstaculizado por el costo económico alto que representa. En estudios con el hongo entomopatógeno *Hirsutella citriformis* Speare y el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera; Liviidae), Raymundo-Jiménez *et al.* (2019) encontraron que el extracto de levadura fue capaz de incrementar significativamente la germinación de conidios en el cuerpo de esta especie de insecto; igualmente indican la desventaja del costo elevado del producto evaluado. En esta investigación evaluamos el efecto del fertilizante Aminocel 500® y el extracto de levadura sobre la germinación de conidios de diversas cepas de los hongos entomopatógenos

and penetration of their hosts (Ram *et al.*, 2018), conidia germination is required to colonize phytopathogenic fungi as well. Thus, the speed of this process is an important factor that enables entomopathogenic fungi and mycoparasites to be more effective in infecting the target organisms. Germination efficiency of the conidia of these biocontrol agents is influenced by the conditions for its production (Daryaei *et al.*, 2016; Mustafa and Kaur, 2009), formulation (Sy *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 1999), environmental conditions (Kaiser *et al.*, 2019; Klingen and Haukeland, 2006; Kredics *et al.*, 2003; Walstad *et al.*, 1970), various agrochemicals (Sain *et al.*, 2019; Abidin *et al.*, 2017; Majchrowska-Safaryan *et al.*, 2017; Mwamburi *et al.*, 2015; Shapiro-Ilan *et al.*, 2013; Klingen and Haukeland, 2006), among others.

Within the diversity of agrochemicals that are applied to cultivated plants, there are some associated with effects on biological control agents (Klingen and Haukeland, 2006). The yeast extract and the Aminocel 500® fertilizer have shown to increase remarkably the conidia germination of entomopathogenic fungi compared to other fertilizers (Ruiz-Amaro *et al.*, 2019); however, the practical use of the former product is hampered by the high economic cost that it represents. In studies with the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* Speare and the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera; Liviidae), Raymundo-Jiménez *et al.* (2019) found that yeast extract was capable of increasing significantly conidia germination in the body of this insect species; they also indicated the disadvantage of the high cost of the evaluated product. In this research, we evaluated the effect of Aminocel 500® fertilizer and yeast extract on the conidia germination of diverse strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals- Criv.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, as well as in the mycoparasite *Trichoderma harzianum* Rifai.

Beauveria bassiana (Bals-Criv.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, así como del micoparásito *Trichoderma harzianum* Rifai.

Materiales y métodos

Se utilizaron dos especies de hongos entomopatógenos, cuatro cepas de *Beauveria bassiana* (Diacit, 33D, 12-10, 37) y dos de *Metarhizium anisopliae* (12-19, 48-C); además de dos cepas del hongo micoparásito *Trichoderma harzianum* (Stgo A31, Stgo A9). Las cepas fueron obtenidas del banco de microorganismos del Campo Experimental General Terán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias (INIFAP), y se reactivaron en el medio de cultivo papa dextrosa agar-acidificado (200 μL de ácido láctico al 85% L^{-1} de medio). Se elaboraron suspensiones de conidios a partir de fragmentos de colonias de 14, 18 y 6 días de edad de cepas de *Beauveria*, *Metarhizium* y *Trichoderma* respectivamente, en los tratamientos a base del fertilizante Aminocel 500® (0.15 %), extracto de levadura (Difco, 0.5 %) y en agua. La concentración utilizada del fertilizante está basada en las recomendaciones del fabricante para su uso en frutales, hortalizas y cultivos básicos; mientras que la concentración del extracto de levadura se basó en las respuestas observadas por Raymundo-Jiménez *et al.* (2019). Los tratamientos fueron elaborados con agua común de pozo, esterilizada por filtración con un filtro de 0.02 μm .

Para determinar la capacidad de germinación de conidios, se colocaron portaobjetos estériles en cajas Petri que contenían agar agua al 2 %. En cada portaobjeto se colocaron dos alícuotas de 20 μL (repeticiones) de cada suspensión y se mantuvieron a 26 °C por 24 hr. Se establecieron cuatro repeticiones (alícuotas) para cada tratamiento. Las cajas fueron abiertas para permitir el secado de las alícuotas, se agregaron 20 μL de lactofenol azul de algodón y se colocó un cubreobjetos sobre cada una. El porcentaje de germinación

Materials and methods

For our study, we used eight strains of three different species of beneficial fungi for agriculture. There were included four and two strains of the entomopathogenic fungi *B. bassiana* (Diacit, 33D, 12-10, and 37) and *M. anisopliae* (12-19, and 48-C), respectively; as well as two strains of the mycoparasitic fungus *T. harzianum* (Stgo A31, and Stgo A9). The strains were obtained from the microorganism bank of the General Terán Experimental Station of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research (INIFAP) at General Terán, N.L., Mexico. They were reactivated in the agar-acidified potato dextrose culture media (200 μL of 85% lactic acid L^{-1} of the culture media). Conidia suspensions were made in the treatments based on the Aminocel 500® fertilizer (0.15%), yeast extract (Difco, 0.5%) and in water, taking fragments of colonies of 14, 18 and 6 days old of *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *T. harzianum* strains, respectively. Used concentration of the fertilizer is based on the manufacturer's recommendations for application in fruit trees, vegetables and basic food crops; while the yeast extract concentration was obtained from the responses observed by Raymundo-Jiménez *et al.* (2019). The conidia suspensions were prepared with tap water sterilized by filtration with a 0.02 μm filter.

In order to determine the conidia germination capacity of the fungi, sterile slides were placed in Petri dishes containing 2% agar-water. Two 20 μL aliquots of each suspension were placed on each slide and kept at 26°C for 24 h. Four replicates were established (two Petri dishes, each with two aliquots on the slide) for each treatment. Posteriorly, the boxes were opened to allow the aliquots to dry, 20 μL of cotton blue lactophenol were added and a coverslip was placed on each one. The germination percentage was determined from the first 100 conidia observed per replicate; they were considered germinated when it was observed under the microscope (40X) at least a

se determinó a partir de los primeros 100 conidios observados bajo el microscopio por cada repetición; éstos fueron considerados germinados al presentar al menos una pequeña hinchazón o elongación en su morfología hasta la presencia de hifas. Se realizó un análisis estadístico para un diseño de dos factores (cepa e inductor de germinación) completamente al azar en el Programa de Diseños Experimentales ver. 1.6, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Olivares, 2015). Se realizaron comparaciones de medias para cada factor e interacción mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados

Cualitativamente, en los inductores evaluados para estimular la germinación de conidios, el extracto de levadura y el fertilizante Aminocel 500® mostraron claramente una abundante presencia de crecimiento micelial en una cepa de cada especie de hongos evaluados (Figura 1). En agua el crecimiento micelial de los conidios germinados fue escaso. Esta respuesta fue relativamente constante para las cepas de hongos evaluados.

Cuantitativamente, se encontraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). En las Figuras 2 y 3, y Cuadro 1 se muestra la comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) realizada para determinar diferencias en porcentaje de germinación de conidios entre los inductores de la germinación, cepas de hongos y en la interacción de ambos factores. De los inductores de germinación evaluados (Figura 2), el extracto de levadura indujo un promedio de 98.1 % de germinación de conidios, seguido del fertilizante Aminocel 500® (89.7 %) y el agua (49.6 %). De las cepas evaluadas (Figura 3), las cepas Diacit y 37 del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, mostraron la mayor germinación con 98 % y 95.9 %, respectivamente; mientras que la cepa de *B. bassiana* 12-10 y las cepas Stgo A31 y Stgo A9 del micoparásito *T. harzianum* alcanzaron los porcentajes más bajos de

perceptible swelling or elongation in their morphology, or presence of hyphae. A statistical analysis was performed for a completely randomized two-factor design (strain and germination inducer) in the Experimental Design Program ver. 1.6 from the Faculty of Agronomy of the Autonomous University of Nuevo León (Olivares, 2015). Comparisons of means for each factor and interaction were made using Tukey test ($p \leq 0.05$).

Results

Qualitatively, in the inducers evaluated to stimulate the germination of conidia, the yeast extract and the Aminocel 500® fertilizer showed clearly an abundant presence of mycelial growth in one strain of each species of the evaluated fungi (Figure 1). In water the mycelial growth of the germinated conidia was scarce. This response was relatively constant for the evaluated fungal strains.

Quantitatively, highly significant differences were found ($p \leq 0.01$). Figures 2 and 3, and Table 1 show the comparison of means (Tukey test; $p \leq 0.05$) performed to determine differences in the percentage of conidia germination among germination inducers, fungal strains and in the interaction of both factors. Yeast extract induced an average of 98.1% germination of conidia, followed by the Aminocel 500® fertilizer (89.7%) and water (49.6%) (Figure 2). Strains Diacit and 37 of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* showed the highest germination with 98% and 95.9%, respectively; while, *B. bassiana* strain 12-10, and strains Stgo A31 and Stgo A9 of the mycoparasite *T. harzianum* reached the lowest germination percentages with 67%, 65.2% and 68.1%, respectively (Figure 3). In the interaction between germination inducers and evaluated strains (Table 1), with the exception of *B. bassiana* Diacit and 37, and *M. anisopliae* 12-19, all strains subjected to water showed the lowest germination percentages and ranged from 0.0% to 51.2% in *T. harzianum* A31 and *B. bassiana* 33D, respectively; in contrast, the conidia of all

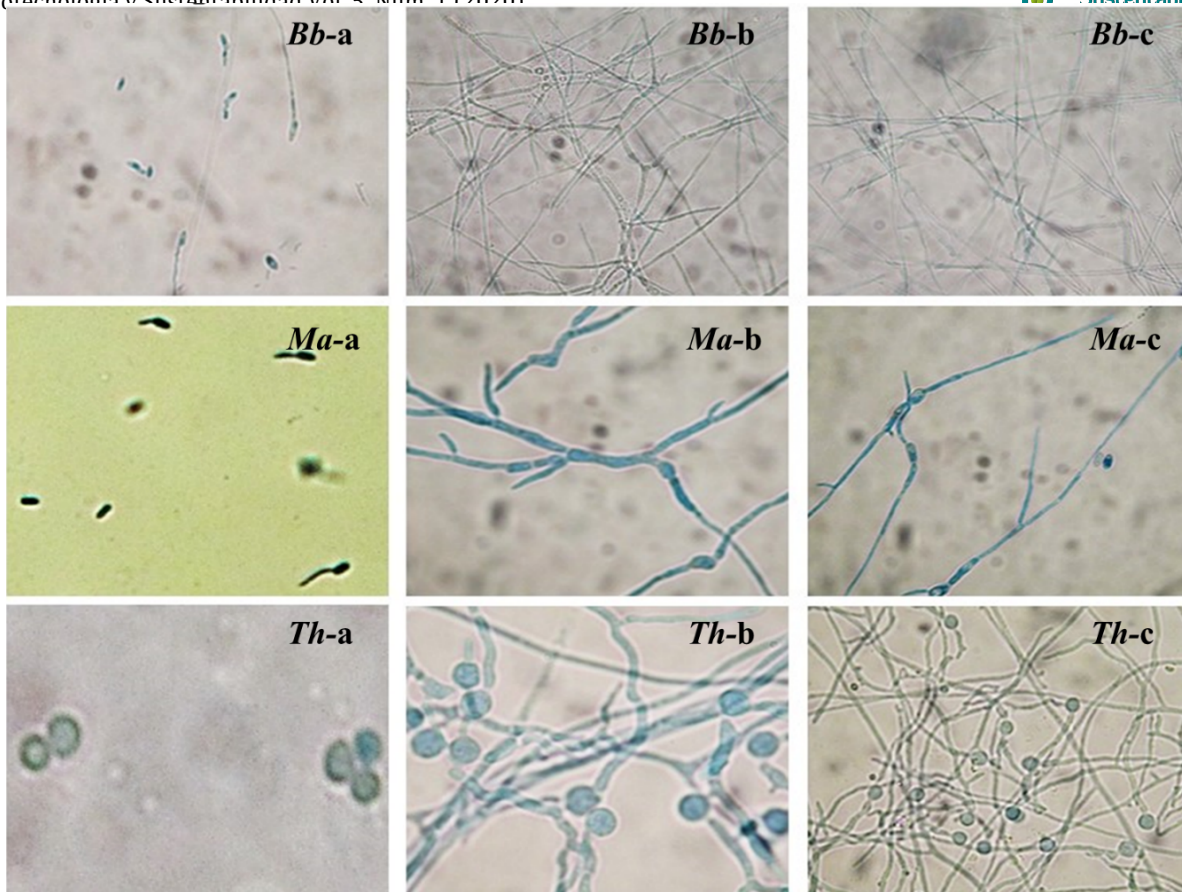


Figure 1. Conidia germination of the fungi *Beauveria bassiana* (**Bb**), *Metarhizium anisopliae* (**Ma**), and *Trichoderma harzianum* (**Th**) promoted by the inducers under evaluation: tap water (**a**), yeast extract (**b**) and the fertilizer Aminocel 500® (**c**).

Figure. 1. Conidia germination of the fungi *Beauveria bassiana* (**Bb**), *Metarhizium anisopliae* (**Ma**), and *Trichoderma harzianum* (**Th**) promoted by the inducers under evaluation: tap water (**a**), yeast extract (**b**) and the fertilizer Aminocel 500® (**c**).

germinación con 67 %, 65.2 % y 68.1 %, respectivamente. En la interacción entre inductores de germinación y cepas evaluadas (Cuadro 1), todas las cepas sometidas a agua, con excepción de *B. bassiana* Diacit y 37, y *M. anisopliae* 12-19, mostraron los porcentajes de germinación más bajos y variaron de 0.0 % a 51.2 % con *T. harzianum* A31 y *B. bassiana* 33D, respectivamente; en contraparte, los conidios de todas las cepas, con excepción de *M. anisopliae* 12-19, alcanzaron los porcentajes de germinación más elevados bajo los inductores extracto de levadura y el fertilizante Aminocel 500, y variaron de 93.0 % con *B. bassiana* 12-10 a 99.7 % en las cepas Diacit y 37 de la misma especie.

strains, with the exception of *M. anisopliae* 12-19, reached the highest germination percentages under the inducers yeast extract and the Aminocel 500® fertilizer, and varied from 93.0% in *B. bassiana* 12-10 to 99.7% in the strains Diacit and 37 of this same fungus. These two latter strains showed high germination percentages (more than 90%) in the three evaluated inducers.

Discussion

In the process of parasitism, the entomopathogenic fungi *B. bassiana*, *M. anisopliae* and the mycoparasite *T. harzianum* requires that the conidia have the ability to germinate. Different factors such as water, nutrients and soil properties, among

Cuadro 1. Porcentaje promedio de germinación de conidios en la interacción de cepas de los hongos benéficos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Trichoderma harzianum* con tres inductores evaluados.

Table 1. Mean percentage of conidia germination in the interaction of strains of the beneficial fungi *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma harzianum* with three evaluated inducers.

Especie (cepa)	% promedio de germinación de conidios ± DE* (n= 4)		
	Agua	Extracto levadura	Aminocel 500®
<i>Beauveria bassiana</i> (Diacit)	95.2 ± 1.25* ab**	99.7 ± 0.50 a	99.0 ± 0.82 a
<i>Beauveria bassiana</i> (33D)	51.2 ± 2.50 d	98.5 ± 1.00 a	93.5 ± 2.65 ab
<i>Beauveria bassiana</i> (12-10)	10.2 ± 1.26 f	97.7 ± 2.06 ab	93.0 ± 6.68 ab
<i>Beauveria bassiana</i> (37)	90.7 ± 3.30 c	99.7 ± 0.50 a	97.2 ± 2.22 ab
<i>Metarhizium anisopliae</i> (12-19)	95.2 ± 1.26 ab	99.5 ± 0.58 a	48.0 ± 6.16 de
<i>Metarhizium anisopliae</i> (48-C)	42.5 ± 2.65 e	94.5 ± 1.91 ab	94.2 ± 0.96 ab
<i>Trichoderma harzianum</i> (Stgo A31)	0.00 ± 0.00 g	98.5 ± 1.00 a	97.0 ± 1.41 ab
<i>Trichoderma harzianum</i> (Stgo A9)	12.0 ± 5.42 f	96.2 ± 2.87 ab	96.0 ± 1.83 ab

*DE= Desviación estándar. **Promedios con letras iguales indican que no existen diferencias entre tratamientos (Tukey, p≤0.05).

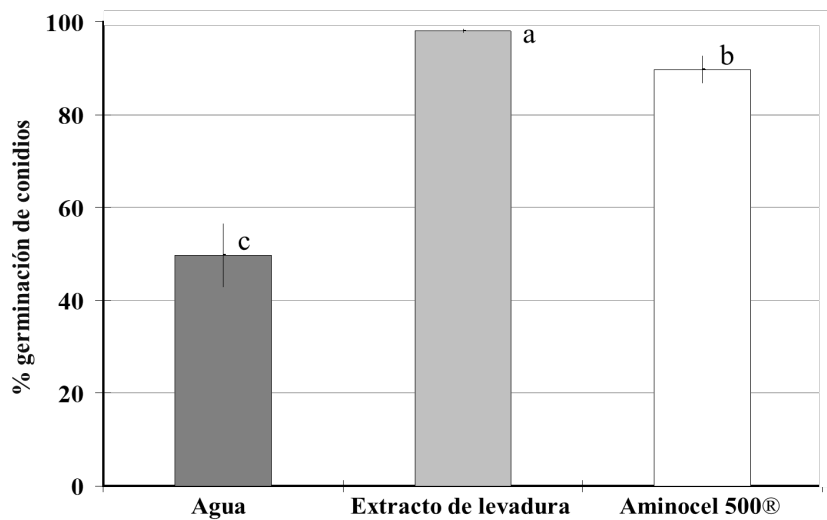


Figura 2. Porcentaje promedio de germinación de conidios en los inductores evaluados sobre cepas de entomopatógenos y un micoparásito. Barras representan promedios de tres inductores de germinación en ocho cepas de hongos. Letras iguales sobre cada barra no difieren entre sí (Tukey, p≤0.05). Líneas en la barra indican el error estándar de los datos (n=32).

Figure 2. Mean percentage of conidia germination of the evaluated inducers on strains of entomopathogens and a mycoparasite. Bars represent means of three germination inducers in eight fungal strains. Equal letters on each bar do not differ from each other (Tukey, p≤0.05). Lines in the bar indicate the standard error of the data (n = 32).

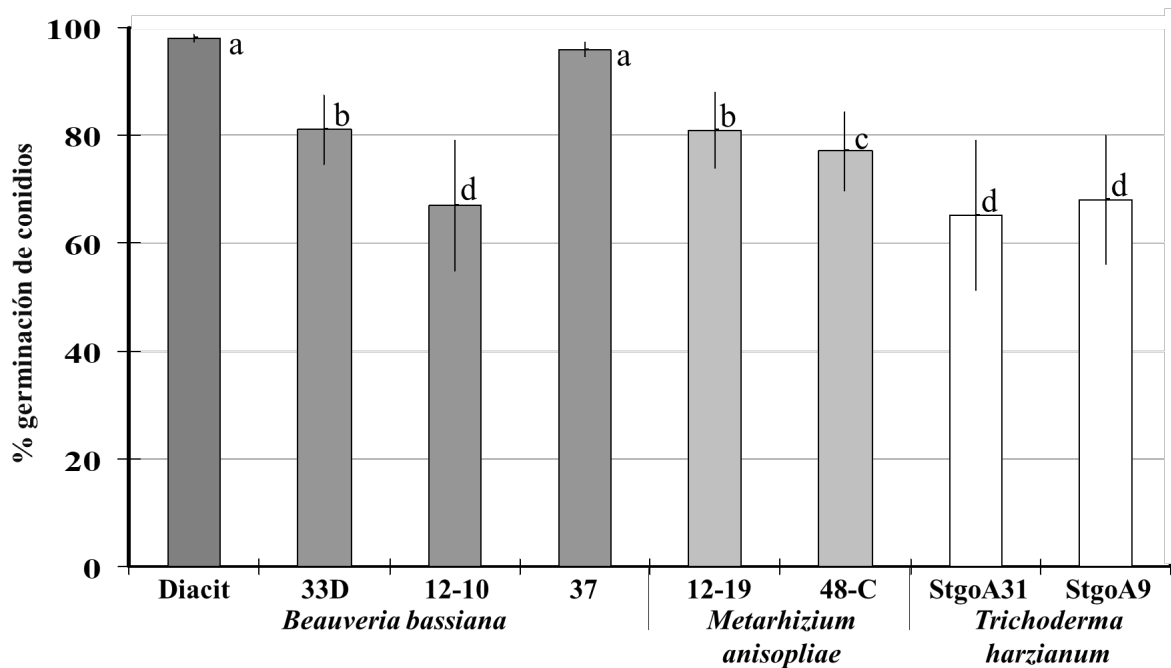


Figura 3. Porcentaje promedio de germinación de cepas de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, y el micoparásito *Trichoderma harzianum*. Barras representan promedios de germinación de cada cepa de hongo en tres inductores de germinación. Letras iguales sobre cada barra no difieren entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$). Líneas en las barras indican el error estándar de los datos ($n = 12$).

Figure 3. Figure 3. Mean percentage of conidia germination of strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. Bars show means of each fungal strain in three germination inducers. Equal letters on each bar do not differ from each other (Tukey, $p \leq 0.05$). Lines in the bars indicate the standard error of the data ($n = 12$).

Estas dos últimas cepas son las que mostraron elevados porcentajes de germinación (más del 90 %) en los tres inductores evaluados.

Discusión

Para iniciar el proceso de parasitismo, los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *M. anisopliae* y el micoparásito *T. harzianum* requieren que los conidios posean la capacidad de germinar. Diferentes factores como agua, nutrientes y factores del suelo, entre otros, pueden influir en la germinación de conidios de estos hongos (Shahid *et al.*, 2012; Benítez *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que los hongos variaron en su respuesta a la germinación con los inductores evaluados; en forma notable se encontró que en el caso de los conidios

others, can influence the conidia germination of these fungi (Shahid *et al.*, 2012; Klingen and Haukeland, 2006; Benítez *et al.*, 2004). The results obtained in this investigation showed that the fungi varied in their response to germination with the different evaluated inducers; notably, it was found that in the case of conidia suspended in water, they had the lowest capacity to germinate (Figure 2). This has been previously reported in various researches for both entomopathogens (Mwamburi *et al.*, 2015; James *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 1999) as well as in *T. harzianum* (Monga, 2001). Regarding these fungi, it has been documented that *Trichoderma* conidia remain without germinating or this capacity is low in water, and that it requires an external source of nutrients to perform it (Papavizas, 1985), as it

suspendidos en agua se registró la menor capacidad para germinar (Figura 2). La germinación escasa de conidios ha sido indicada previamente en diversas investigaciones para ambos entomopatógenos (Mwamburi *et al.*, 2015; James *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 1999) y *T. harzianum* (Monga, 2001). De estos hongos, se ha documentado que los conidios de *Trichoderma* se mantienen sin germinar o esta capacidad es baja en agua, y que requiere una fuente externa de nutrientes para hacerlo (Papavizas, 1985), tal como se observó en nuestra investigación (Figura 2; Cuadro 1). Los inductores extracto de levadura y el fertilizante Aminocel 500® incrementaron notoriamente la germinación de los conidios respecto a las suspensiones de conidios en agua (Figura 2), excepto en la cepa 12-19 de *M. anisopliae* en el fertilizante (Cuadro 1). En experimentos realizados con diversos propósitos se ha demostrado que el extracto de levadura (fuente de proteína) actúa como un importante inductor de la germinación de hongos agentes de biocontrol (Raymundo-Jiménez *et al.*, 2019; St Leger *et al.*, 1994; Milner *et al.*, 1991; James *et al.*, 2003).

Aunque se ha evaluado la compatibilidad de insecticidas, herbicidas y fungicidas con hongos agentes de biocontrol (Karpagavalli y Kumar, 2020; Pelizza *et al.*, 2018; Soesanto *et al.*, 2018; Bhale y Rajkonda, 2015; Silva *et al.*, 2013), son escasas las investigaciones del impacto que poseen los fertilizantes químicos sobre éstos. Algunos de estos productos han demostrado incrementar el crecimiento y producción de conidios de cepas del género *Trichoderma* en laboratorio (Montoya-Gonzalez *et al.*, 2016; Khattabi *et al.*, 2004), mientras que fertilizantes orgánicos incrementan la abundancia de *Beauveria* y *Metarhizium* en suelos (Majchrowska-Safaryan *et al.*, 2017; Clifton *et al.*, 2015). También se ha documentado en laboratorio que biofertilizantes reducen o incrementan en forma no significativa la germinación de

was observed in our investigation (Figure 1). Both inducers, the yeast extract and the Aminocel 500® fertilizer, strongly increased the germination of the conidia with respect to the suspensions of conidia in water (Figure 1), except in strain 12-19 of *M. anisopliae* in Aminocel 500® (Table 1). In experiments carried out for various purposes, it has been shown that yeast extract (protein source) acts as an important inducer of conidia germination in fungal biocontrol agents (Raymundo-Jiménez *et al.*, 2019; St Leger *et al.*, 1994; Milner *et al.*, 1991; James *et al.*, 2003).

Although the compatibility of insecticides, herbicides and fungicides with beneficial fungi for pest control has been evaluated (Karpagavalli and Kumar, 2020; Pelizza *et al.*, 2018; Soesanto *et al.*, 2018; Bhale and Rajkonda, 2015; Silva *et al.*, 2013; Klingen and Haukeland, 2006), investigations of the impact that chemical fertilizers have on them are scarce. In laboratory, some of these products have shown to increase the growth and production of conidia of strains of the *Trichoderma* genus (Montoya-Gonzalez *et al.*, 2016; Khattabi *et al.*, 2004); while organic fertilizers increase the abundance of *Beauveria* and *Metarhizium* in soils (Majchrowska-Safaryan *et al.*, 2017; Clifton *et al.*, 2015). It has also been documented in the laboratory that biofertilizers do not reduce or increase significantly the germination of these two entomopathogens (Hirose *et al.*, 2001). Aminocel 500® is a fertilizer that contains a high percentage of amino acids (50%), between 8-10% of nitrogen, phosphorus and potassium and low percentages of other elements. It is possible that the stimulation of germination by yeast extract and Aminocel 500® is influenced by the presence of nitrogen compounds in both products.

Our methodological approach in the present study to evaluate the germination capacity of fungal fertilizers was previously used in different experiments by the authors (see Raymundo-Jiménez *et al.*, 2019; Ruiz-

estos dos entomopatógenos (Hirose *et al.*, 2001). El Aminocel 500® es un fertilizante que contiene un elevado porcentaje de aminoácidos (50 %), entre 8 – 10 % de nitrógeno, fósforo y potasio, y porcentajes bajos de otros elementos. Es posible que la estimulación de la germinación por el extracto de levadura y el Aminocel 500® esté influenciada por la presencia de compuestos nitrogenados en ambos productos.

Nuestro enfoque metodológico en el presente estudio para evaluar la capacidad de germinación de conidios de hongos agentes de biocontrol en fertilizantes químicos, fue utilizada previamente en diferentes experimentos por los autores del presente estudio (ver Raymundo-Jiménez *et al.*, 2019; Ruiz-Amaro *et al.*, 2019). Al utilizar agua común como soporte de los compuestos a evaluar en la germinación de conidios suspendidos, y depositar estas suspensiones sobre portaobjetos estériles en cajas Petri, sin ninguna otra fuente de nutrientes, básicamente es un método que evita que factores nutricionales ajenos a los tratamientos influyan en la germinación, como es el caso cuando se utilizan medios de cultivo enriquecidos para el mismo propósito (Pelizza *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2013); bajo esta última metodología los efectos resultantes se confunden o mezclan de forma inevitable.

La práctica de usar agua común como vehículo en la aplicación de hongos agentes de biocontrol es rutinaria para los agricultores; sin embargo, en nuestro estudio los resultados sugieren que la germinación de los conidios es escasa en la mayoría de las cepas de los hongos aquí evaluados cuando son suspendidos en agua. Aun cuando en esta investigación y otras realizadas por los autores del presente estudio (Raymundo-Jiménez *et al.*, 2019; Ruiz-Amaro *et al.*, 2019), el extracto de levadura produjo un porcentaje mayor de germinación de conidios de los hongos agentes de biocontrol evaluados, éste tiene un costo elevado, por lo que sería económicamente inviable su utilización en aplicaciones en campo, ya que

Amaro *et al.*, 2019). By using tap water as a support for the compounds to be evaluated on the germination of suspended conidia, and depositing these suspensions on sterile slides in Petri dishes, without any other source of nutrients, is a method that prevents nutritional factors unrelated to the treatments from influencing germination, as it is the case when enriched culture media are utilized for the same purpose (Pelizza *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2013); under this methodology the resulted effects are confused or mixed in an unavoidable way.

In the application of fungal biocontrol agents, the practice of using tap water as a vehicle is common among farmers; however, in our study the results suggest that conidia germination is scarce in most of the strains of the fungi evaluated here when they are suspended in water. Even though in this research and others carried out by the authors (Raymundo-Jiménez *et al.*, 2019; Ruiz-Amaro *et al.*, 2019), the yeast extract had the highest percentage of conidia germination of the evaluated biocontrol agent fungi, a probable use of this product characteristically has a high economic cost; therefore, it would be economically unprofitable to apply it in field sprays. Presently, this product can exceed 22 times the cost of Aminocel 500®. In regard of this chemical fertilizer, its use as a regular maintenance practice of citrus orchards, supports the possibility of being widely used for the practical application of these biological control agents, without representing additional costs for its use, producing savings by using the same spray to apply both, and generating a function that notably increases the germination potential of conidia of these beneficial fungi. The results obtained in our study encourage the evaluation of the impact of the simultaneous application of Aminocel 500® with fungal agents in the biological control of arthropod pests and phytopathogenic fungi; the potential for its practical use will depend on the results of these evaluations. Finally, as a disclaimer, it is necessary to indicate that our study does not

este producto puede superar 22 veces el costo del Aminocel 500®. En lo que respecta a este fertilizante químico, su utilización como práctica regular en el mantenimiento de huertas de cítricos, sustenta la posibilidad de emplearse ampliamente para la aplicación práctica de estos agentes de control biológico, sin representar costos adicionales por su uso, producir ahorros por emplearse la misma aspersión para aplicar a ambos, y generar una función que incrementa notablemente el potencial de germinación de conidios de dichos hongos benéficos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren evaluar el impacto de la aplicación simultánea de Aminocel 500® con hongos agentes de biocontrol en el control biológico de plagas y hongos fitopatógenos; el potencial de su uso práctico dependerá de los resultados de estas evaluaciones. Finalmente, como descargo de responsabilidad, es necesario indicar que nuestro estudio no implica o pretende descartar, avalar o promocionar productos.

Conclusiones

La germinación de conidios de hongos agentes de biocontrol es favorecida notoriamente por el extracto de levadura y el fertilizante Aminocel 500®, mientras que el agua es un débil inductor para la mayoría de las cepas evaluadas en el estudio. El Aminocel 500® es un fertilizante que puede ser utilizado como inductor de la germinación y de manera compatible y económica con los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, y el micoparásito *Trichoderma harzianum*.

Agradecimientos

Se agradece al INIFAP el apoyo financiero para la realización de esta investigación como parte del Proyecto "Aprovechamiento de la biodiversidad microbiana contra problemas fitosanitarios de cultivos del área de influencia del CIR-Noreste". Agradecemos también al Dr. Isidro H. Almeyda León y Dra. Reyna I. Torres

imply or intend to discard, endorse or promote products.

Conclusions

The germination of conidia of fungal biocontrol agents is notably favored by the yeast extract and the Aminocel 500® fertilizer, while in comparison, water is a weak inducer for most of the strains evaluated in the study. Aminocel 500® is a fertilizer with high potential to be used as a germination inducer in a compatible and economical way with the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and the mycoparasite *Trichoderma harzianum*.

Acknowledgments

We are deeply grateful to INIFAP for the financial support to carry out this research as part of the project "Aprovechamiento de la biodiversidad microbiana contra problemas fitosanitarios de cultivos del área de influencia del CIR-Noreste". We also thank Dr. Isidro H. Almeyda León and Dr. Reyna I. Torres Acosta for their suggestions to improve the document.

References

Acosta sus sugerencias para mejorar el documento.

Referencias

- Abidin, A.F., Ekowati, N., and Ratnaningtyas, N.I. 2017, Compatibility of insecticides with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, *Scripta Biologica*, vol. 4, pp. 273-279.
- Bale, J.S., Van Lenteren, J.C. and Bigler, F. 2007, Biological control and sustainable food production, *Philosophical Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, vol. 363, pp. 761-776.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. and Codon, A.C. 2004, Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains, *Internat. Microbiol.*, vol.7, pp. 249-260.
- Bhale, U.N. and Rajkonda, J.N. 2015, Compatibility of fungicides and antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against plant pathogens, *Biosci. Methods*, vol. 6, pp. 1-9.
- Clifton, E.H., Jaronski, S.T., Hodgson, E.W. and Gassmann, A.J. 2015, Abundance of soil-borne entomopathogenic fungi in organic and conventional fields in the Midwestern USA with an emphasis on the effect of herbicides and fungicides on fungal persistence, *PloS One*, vol. 10, e0133613.
- Daryaei, A., Jones, E.E., Ghazalibiglar, H., Glare, T. R. and Falloon, R.E. 2016, Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 120, pp. 999-1009.
- Ferron, P. and Deguine, J. P. (2005). Crop protection, biological control, habitat management and integrated farming. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 25:17-24.
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W.W., Emmerson, M., Morales, M.B., Ceryngier, P., Liira, J., Tscharncke, T., Winqvist, C., Eggers, S., Bommarco, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L.W., Dennis, Ch., Palmer, C., Oñate, J.J., Guerrero, I., Hawro, V., Aavik, T., Thies, C., Flohre, A., Hänke, S., Fischer, Ch., Goedhart, P.W. and Inchausti, P. 2010, Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland, *Basic Appl. Ecol.*, vol. 11, pp. 97-105.
- Hirose, E., Neves, P.M., Zequi, J.A., Martins, L.H., Peralta, C.H., and Moino Jr., A. 2001, Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Brazilian Arch. Biol. Tech.*, vol. 44, no. 4, pp. 419-423.
- Ibrahim, L., Butt, T.M., Beckett, A. and Clark, S.J. 1999, The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*, *Mycological Res.*, vol. 103, pp. 901-907.
- James, R.R., Buckner, J.S. and Freeman, T.P. 2003, Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*, *J. Invert. Pat.*, vol. 84, pp. 67-74.
- Kaiser, D., Bacher, S., Mène-Saffrané, L. and Grabenweger, G. 2019, Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation, *Pest Man. Sc.*, vol. 75, pp. 556-563.
- Karpagavalli, S. and Kumar, N.K. 2020, Interaction of fungicides on the growth of *Trichoderma viride*, *J. Pharmacognosy Phytochem.*, vol 9, pp. 922-924.
- Khan, S., Guo, L., Maimaiti, Y., Mijit, M. and Qiu, D. 2012, Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent, *Mol. Plant Breeding*, vol. 3, pp. 63-79.
- Khatabi, N., Ezzahiri, B., Louali, L. and Oihabi, A. 2004, Effect of nitrogen fertilizers and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii*, *Agronomie, EDP Sci.*, vol. 24, pp. 281-288.

- Kibria, G. 2016, Pesticides and its impact on environment, biodiversity and human health- A short review. 5p. DOI: 10.13140/RG.2.1.4487.4965/1. <https://www.researchgate.net/publication/266618490>.
- Klingen, I. and Haukeland, S. 2006, "The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes" in *An ecological and societal approach to biological control*, ed. J. Eilenberg and H.M.T. Hokkanen, Springer, The Netherlands, pp. 145-211.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. and Nagy, E. 2003, Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential, *Food Tech. Biotech.*, vol. 41, pp. 37-42.
- Majchrowska-Safaryan, A., Tkaczuk, C. and Symanowicz, B. 2017, Effects of the application of a mineral-and-organic fertilizer produced from brown coal on the occurrence and infectious potential of entomopathogenic fungi in soil, *J. Ecol. Engine.*, vol. 18, no. 140-148.
- Mustafa, U. and Kaur, G. 2009, Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates, *African J. Agric. Res.*, vol. 3, pp. 922-930.
- Milner, R.J., Huppatz, R.J. and Swaris, S.C. 1991, A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia, *J. Invert. Pat.*, vol. 57, pp. 121-123.
- Monga, D. 2011, Effect of carbon and nitrogen sources on spore germination, bio-mass production and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium*, *Indian Phytopathology*, vol. 54, pp. 435-437.
- Montoya-Gonzalez, A.H., Quijano-Vicente, G., Morales-Maza, A., Ortiz-Uribe, N. and Hernandez-Martinez, R. 2016, Isolation of *Trichoderma* spp. from desert soil, biocontrol potential evaluation and liquid culture production of conidia using agricultural fertilizers, *J. Fertil. Pestic.*, vol.7, pp. 163.
- Mwamburi, L.A., Laing, M.D. and Miller, R.M. 2015, Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*, *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 46, pp. 67-74.
- Olivares, S.E. 2015, *Programa de diseños experimentales FAUANL, versión 1.6.*, Facultad Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L., Méx.
- Papavizas, G.C. 1985, *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol, *Ann. Rev. Phytopathology*, vol. 23, pp. 23-54.
- Pelizza, S.A., Schalamuk, S., Simón, M.R., Stenglein, S.A., Pacheco-Marino, S.G. and Scorsetti, A.C. 2018, Compatibility of chemical insecticides and entomopathogenic fungi for control of soybean defoliating pest, *Rachiplusia nu*, *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 50, pp. 189-201.
- Ram, R.M., Keswani, C., Bisen, K., Tripathi, R., Singh, S.P. and Singh, H.B. 2018, "Biocontrol technology: eco-friendly approaches for sustainable agriculture" in *Omics Technologies and Bio-engineering. Towards Improving Quality of Life*, ed. D. Barh and V. Azevedo, Academic Press, pp. 177-190.
- Raymundo-Jiménez, R., García-Ibarra, E., López-Arroyo, J.I., Ramírez-Cabral, N.Y.Z. y Rodríguez-Guerra, R. 2019, Producción y germinación de conidios del hongo entomopatógeno *Hirsutella citrifomis* (Ascomycota: Ophiocordycipitaceae), *Scientia Fungorum*, vol. 49, e1221.
- Ruiz-Amaro, C.J., Rodríguez-Guerra, R., López-Arroyo, J.I. y Almeyda-León, I.H. 2019, "Germinación de conidios de hongos entomopatógenos en fertilizantes" en *Memoria de la XXXI Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED*,

- FAZ-UJED, Gómez Palacio, Dgo., Méx., pp. 772-775.
- Sain, S.K., Monga, D., Kumar, R., Nagrale, D.T., Hiremani, N.S. and Kranthi, S. 2019, Compatibility of entomopathogenic fungi with insecticides and their efficacy for IPM of *Bemisia tabaci* in cotton, *J. Pest. Sci.*, vol. 44, no. 2, pp. 97-105.
- Shahid, A.A., Rao, Q.A., Bakhsh, A. and Husnain, T. 2012, Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity, *Arch. Biol. Sci.*, vol. 64, pp. 21-42.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gardner, W.A., Wells, L., Cottrell, T.E., Behle, R.W. and Wood, B.W. 2013, Effects of entomopathogenic fungus species, and impact of fertilizers, on biological control of pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae), *Environ. Entomol.*, vol. 42, pp. 253-261.
- Sharma, A., Diwevidi, V.D., Singh, S., Pawar, K.K., Jerman, M., Singh, L.B., Singh, S. and Srivastaway, D. 2013, Biological control and its important in agriculture, *Inter. J. Biotech. Bioengine. Res.*, vol. 3, pp. 175-180.
- Silva, R.A.D., Quintela, E.D., Mascarin, G.M., Barrigossi, J.A.F. and Lião, L.M. 2013, Compatibility of conventional agrochemicals used in rice crops with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *Scientia Agricola*, vol. 70, pp. 152-160.
- Soesanto, L., Mugiastuti, E., Rahayuniati, R.F., Manan, A., and Dewi, R.S. 2018, Compatibility test of four *Trichoderma* spp. isolates on several synthetic pesticides, *J. Agric. Sci.*, vol. 40, pp. 481-489.
- St Leger, R.J., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. 1994, Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species, *Microbiol.*, vol 140, pp. 1651-1660.
- Sy, V.E., Schalamuk, S., Scorsetti, A.C. and Botto, I.L. 2016, Volcanic materials as carriers for the formulation of mycoinsecticides using the fungus *Beauveria bassiana*, *International J. Agric. Nat. Resources*, vol. 43, pp. 273-282.
- Tracy, E.F., 2014, The promise of biological control for sustainable agriculture: a stakeholder-based analysis, *J. Sci. Policy Gover.*, [En línea] vol. 5, no. 1, [15 agosto 2020].
- Walstad, J.D., Anderson, R.F. and Stambaugh, W.J. 1970, Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*), *J. Invert. Pat.*, vol. 16, pp. 221-226.