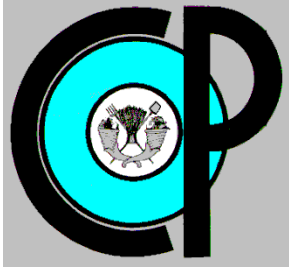


# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---



**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS**

**AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**“DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE  
POBLACIONES DE HONGOS PATÓGENOS INFECTANDO  
LARVAS DE GALLINA CIEGA EN GUANAJUATO, MÉXICO”**

**MARÍA GUADALUPE CARRILLO BENITEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2012**

La presente tesis titulada: **DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE HONGOS PATÓGENOS INFECTANDO LARVAS DE GALLINA CIEGA EN GUANAJUATO, MÉXICO**, realizada por la alumna: **MARIA GUADALUPE CARRILLO BENITEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

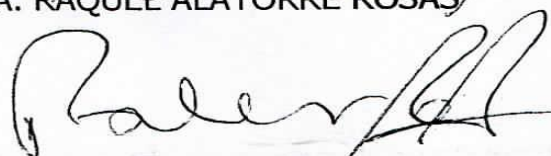
CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO


ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. PILAR RODRÍGUEZ GUZMÁN

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. OMAR ALEJANDRO PÉREZ VERA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2012

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE HONGOS  
PATÓGENOS INFECTANDO LARVAS DE GALLINA CIEGA EN GUANAJUATO,  
MÉXICO**

MARÍA GUADALUPE CARRILLO BENITEZ, DRA.

Colegio de Postgraduados, 2012

**ABSTRACT**

Fungal entomopathogens are commonly found in soil, therefore knowledge of endemic isolates should be considered before any attempt to introduce exotic isolates in a determined geographical region. White grub larvae are important pests in Guanajuato and other regions of Mexico as they attack many important crops such as maize. Although chemical control of this insect species is the main strategy applied, its use has not been efficient and other alternatives are needed. Microbial control of soil dwelling pests is an important strategy; the fungal species within the genus *Beauveria* and *Metarhizium* are considered amongst the most promising candidates. Here we report the results of a survey carried out to find entomopathogenic fungi infecting white grub larvae in different regions of Guanajuato, Mexico. Healthy larvae were sampled, incubated in laboratory and any fungal pathogen found was isolated. Infectivity of isolates obtained was confirmed in healthy larvae of *Phyllophaga polyphylla*. Isolates were identified using morphological and molecular methods. The genetic population structure using microsatellites and genetic diversity were assessed using microsatellite markers and ERIC fingerprinting respectively, for the *Beauveria* isolates. Seventeen *Beauveria* and two *Metarhizium* isolates were obtained. All isolates infected healthy larvae of *P. polyphylla* in different proportions but never above 50%. Based on Elongation Factor 1  $\alpha$ , ITS and  $\beta$ -tubulin genes sequence information, all *Beauveria* isolates were identified as *Beauveria pseudobassiana* and the *Metarhizium* isolates were identified as *M. pingshaense*. Three additional *Metarhizium* isolates obtained in the same region but a year before were identified as *M. pingshaense*, *M. anisopliae* and *M. robertsii*. Microsatellite genotyping showed that all *B. pseudobassiana* isolates were grouped in one haplotype. ERIC fingerprinting information confirmed no significant variation amongst the *B. pseudobassiana* isolates. The ecological role of these isolates and their impact on white grub larvae populations is discussed.

**Keywords:** *Beauveria pseudobassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium pingshaense*, *Metarhizium robertsii*, taxonomía molecular, microsatélites, ERIC, *Phyllophaga polyphylla*.

## RESUMEN

Los hongos entomopatógenos se encuentran comúnmente en el suelo, por lo que el estudio y determinación de poblaciones nativas de estos microorganismos, previos a la introducción de aislamientos exóticos, es importante. Las larvas de gallina ciega causan daños a cultivos importantes como el maíz en Guanajuato y otras regiones de México. La principal estrategia de manejo de esta plaga es el control químico; sin embargo, su efecto no ha sido suficiente por lo que se requiere de otras alternativas. El control microbiano es una de las estrategias más importantes para plagas de suelo, y especies dentro de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* están consideradas entre los candidatos más prometedores. Esta investigación reporta los resultados de un estudio que se llevó a cabo para encontrar hongos entomopatógenos infectando larvas de gallina ciega en diferentes regiones de Guanajuato, México. Larvas de gallina ciega fueron colectadas, incubadas en el laboratorio y los hongos entomopatógenos encontrados fueron aislados. La infectividad de los aislamientos obtenidos fue confirmada en larvas sanas de la especie *Phyllophaga polyphylla*. Los aislamientos fueron identificados con métodos morfológicos y moleculares. La estructura y diversidad genética de poblaciones de los aislamientos de *B. pseudobassiana* se evaluó a través de Microsatélites y la detección de secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC). Se obtuvieron 17 aislamientos de *Beauveria* y dos de *Metarhizium*. Todos los aislamientos infectaron a larvas de *P. polyphylla* en diferentes proporciones pero nunca por encima del 50%. Con base de secuencias parciales obtenidas de los genes Factor de Elongación 1- $\alpha$ , región ITS del ARN ribosomal y  $\beta$ -tubulina, todos los aislamientos de *Beauveria* fueron identificados como *Beauveria pseudobassiana* y los aislamientos de *Metarhizium* fueron identificados como *M. pingshaense*. Se agregaron tres aislamientos de *Metarhizium* colectados en otras regiones de Guanajuato pero un año antes, y estos fueron identificados como *M. pingshaense*, *M. anisopliae* y *M. robertsii*. Los microsatélites genotipificados mostraron que todos los aislamientos de *B. pseudobassiana* fueron agrupados en un solo haplotipo. El análisis ERIC confirmó que no hay variación genética entre aislamientos de *B. pseudobassiana*. Se discute la función ecológica de estos aislamientos y su impacto en poblaciones de larvas de gallinas ciegas.

**Palabras clave:** *Beauveria pseudobassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium pingshaense*, *Metarhizium robertsii*, taxonomía molecular, microsatélites, ERIC,

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme el don de la vida y por cada mañana.

A mis Padres Lupita y Amadeo por ser mis grandes amigos, por sus enseñanzas de vida, por su apoyo y amor incondicional.

A Marquitos mi travieso sobrinito, que siendo tan pequeño me dio una gran lección de vida.

A Danielito mi sobrinito por las sonrisas que me regala sin pedir las y al sobrinito Bebé que viene en camino

A mis hermanitas Dolores y Paty, por su apoyo y cariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ariel por aceptarme como su estudiante, por transmitirme sus conocimientos, por su paciencia, por su constancia y apoyo en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Raquel por haberme transmitido sus conocimientos, por su paciencia, consejos y apoyo para que este trabajo fuera mejor.

Al Dr. Esteba, la Dra. Pilar y el Dr. Omar, por las horas robadas de su tiempo dedicadas a mi tesis y sus palabras de aliento.

A mis amigos: Jose Porfirio Vega(†) donde quiera que este amigote, Yazmin Garduño, Susana Ramírez, Fabian Grifaldo, Jorge Hernández, Nicolas Martinez, Victor Pérez, Jhony Navat, Gabriela Hernández, Santo Morales, Carolina Pérez, Nuvia Orduño, Josefa Jimenez, Mauricio G.; muchas gracias a todos por su voz de aliento, su ayuda y amistad invaluable.

Al CESAPEG, Proyecto: Control Biológico de gallina ciega con hongos y nematodos entomopatógenos.

Al CONACYT, gracias por la beca otorgada, la cual me ayudó a realizar mis estudios de Doctorado.

Al Colegio de Postgraduados por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al COMECYT por la beca otorgada para concluir las últimas actividades de esta tesis.

## INDÍCE

	Página
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>1.1 Introducción</b> .....	1
<b>1.2 Hongos entomopatógenos</b> .....	2
<b>1.3 Factores que afectan la diversidad y distribución de los hongos</b> .....	4
<b>1.4 Complejo gallinas ciegas (Coleptera: Scarabaeidae) Melolonthidae</b> .....	5
1.4.1 Daños y control de larvas de gallinas ciegas .....	5
1.4.2 Control Microbiano de larvas de gallina ciega .....	6
1.4.2.1 Descripción general de Beauveria .....	7
1.4.2.2 Descripción general del género Metarhizium.....	7
<b>1.5 OBJETIVO</b> .....	8
<b>CAPÍTULO II. OBTENCIÓN DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS A PARTIR DE LARVAS DE GALLINA CIEGA</b> .....	13
<b>2.1 Introducción</b> .....	13
<b>2.2. Material y Métodos</b> .....	14
2.2.1 Obtención de aislamientos.....	14
2.2.1.1 Obtención de cultivos monospóricos .....	15
2.2.1.2 Preservación de aislamientos.....	15
<b>2.3 Evaluación de la capacidad de infección de aislamientos obtenidos en larvas de Phyllophaga polyphylla y Anomala cincta</b> .....	16
2.3.1 Aislamientos de hongos entomopatógenos .....	16
2.3.1.1 Suspensión de conidios.....	17
2.3.2 Establecimiento del experimento .....	17
2.3.2.1 Análisis de datos .....	18
<b>2.4. Resultados</b> .....	19
2.4.1 Búsqueda de aislamientos nativos. ....	19

2.4.2 Evaluación de la capacidad de infección de los aislamientos.....	20
<b>2.5 Discusión</b> .....	21
<b>2.6 Literatura citada</b> .....	23
<b>CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE HONGOS</b> .....	26
<b>3.1 Introducción</b> .....	26
<b>3.2 Uso de Técnicas Moleculares en la determinación taxonómica</b> .....	26
3.2.1 Espacios Transcritos Internos (ITS-PCR).....	28
3.2.2 Factor de Elongación-1 alfa (EF-1 $\alpha$ ).....	28
3.2.3 $\beta$ -tubulina.....	29
3.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	29
<b>3.3. Material y Métodos</b> .....	30
3.3.1 Identificación morfológica de los aislamientos.....	30
3.3.2 Identificación molecular.....	31
3.3.2.1 Producción de micelio y extracción de ADN.....	31
3.3.2.2 Amplificación de la región ITS.....	32
3.3.2.3 Amplificación de una región Bt2 del gen $\beta$ -tubulina.....	33
3.3.2.4 Amplificación de una región del gen Factor de elongación-1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )..	33
3.3.2.5 Limpieza y obtención de las secuencias de los productos de PCR.....	34
3.3.2.6 Análisis de los datos.....	35
<b>3.4 Resultados</b> .....	35
3.4.1 Identificación morfológica.....	35
3.4.1.1 Determinación específica con base en la morfología del conidio.....	36
3.4.3 Identificación molecular.....	39
3.4.3.1 Amplificación de la región ITS.....	39
3.4.3.2. Amplificación de una región del gen EF-1 $\alpha$ .....	41
3.4.3.3. Amplificación de la región Bt2 del gen $\beta$ -tubulina.....	43
<b>3.5 Discusión</b> .....	46
<b>3.6 Literatura citada</b> .....	47



<b>CAPÍTULO IV. VARIACIÓN GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE <i>Beauveria</i></b> .....	51
<b>4.1 Introducción</b> .....	51
<b>4.2 ERIC (Secuencias Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias)</b>	51
<b>4.3 Microsatélites</b> .....	52
<b>4.4 Material y Métodos</b> .....	53
4.4.1 Análisis ERIC .....	53
4.4.2 Microsatélites .....	53
4.4.3 Análisis de datos .....	54
<b>4.5 Resultados</b> .....	54
4.5.1 ERIC-PCR .....	54
4.5.2 Microsatélites .....	55
<b>4.6. Discusión</b> .....	57
<b>4.7 Literatura citada</b> .....	58
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	60
<b>5.1 Literatura citada</b> .....	63
<b>ANEXO</b> .....	66

## INDICE DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1	Porciones de infección logradas en larvas de <i>Phyllophaga polyphylla</i> .....	20
Figura 2	Número de larvas de <i>Anomala</i> infectadas con aislamientos de <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> .....	21
Figura 3	Gráfica de la matriz de los componentes de conidios de <i>Beauveria</i> .....	37
Figura 4	Gráfica de la matriz de los componentes de conidios de <i>Metarhizium</i> .....	38
Figura 5	Dendrograma de <i>Beauveria</i> para secuencias ITS.....	40
Figura 6	Dendrograma para <i>Metarhizium</i> para secuencias las secuencias ITS.....	41
Figura 7	Dendrograma de <i>Beauveria</i> para secuencias EF-1 $\alpha$ .....	42
Figura 8	Dendrograma para <i>Metarhizium</i> para secuencias EF-1 $\alpha$ .....	43
Figura 9	Dendrograma para <i>Metarhizium</i> para secuencias $\beta$ -tubulina.....	44
Figura 10	Dendrograma para <i>Beauveria</i> para secuencias $\beta$ -tubulina.....	45
Figura 11	Dendrograma de similitud para ERIC en aislamientos de <i>B. pseudobassiana</i> .....	56
Figura 12	Dendrograma de similitud para Microsatélites en aislamientos de <i>B. pseudobassiana</i> .....	57

## INDICE DE CUADROS

		Pagina
Cuadro 1	Géneros importantes de hongos entomopatógenos.....	3
Cuadro 2	Localidades de colecta en el estado de Guanajuato.....	14
Cuadro 3	Lugares de selección para la colecta.....	19
Cuadro 4	Aislamientos de larvas de gallina ciega en diversas regiones del estado de Guanajuato.....	35
Cuadro 5	Aislamientos obtenidos de la colección de Patología de insectos.....	36
Cuadro 6	Correlación entre variables y componentes para conidios de <i>Beauveria</i> .....	36
Cuadro 7	Correlación entre variables y componentes para conidios de <i>Metarhizium</i> .....	38

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 Introducción

Los hongos entomopatógenos tienen una distribución cosmopolita, y el suelo es el mayor reservorio de estos microorganismos (Meyling y Eilenberg, 2007). Los hongos entomopatógenos se caracterizan por su capacidad de adherirse, penetrar la cutícula y replicarse dentro de su hospedante, generalmente en el hemocele. A esto se agrega que pueden destruir e invadir otros tejidos y también se relacionan con sustancias tóxicas que intervienen en el desarrollo (Boucias y Pendland, 1998). Sin embargo, la capacidad de infección en estos microorganismos es determinada por diversos factores como los patrones de comportamiento de insectos y factores abióticos como la temperatura, la luz y la humedad. Una humedad alta es necesaria para germinación de los conidios en la cutícula del hospedante, mientras que la humedad relativa alta favorece la formación de esporas y consecuentemente la dispersión a nuevos hospedantes (Fuxa y Tanada, 1987). Los hongos entomopatógenos pueden ser un componente esencial del control biológico en artrópodos plaga, la introducción de estos microorganismos en un ambiente determinado para la reducción de poblaciones de insectos plaga es una práctica común de control biológico; sin embargo, la interacción de estos agentes introducidos con aislamientos nativos es inevitable, y esta interacción puede no ser favorable para el manejo de poblaciones insectiles, por esta razón, el conocimiento previo de las poblaciones nativas, antes de la introducción de un agente de control microbiano es de suma importancia para entender dichas interacciones (Sevim *et al.*, 2010).

Las larvas de Scarabaeidae: Melolonthidae (Coleoptera) *Phyllophaga* y *Anomala*, comúnmente conocidas como gallinas ciegas, son una plaga de importancia en diversas regiones de México incluyendo el estado de Guanajuato. El manejo de esta plaga mediante hongos entomopatógenos se ha sido estudiado en otras regiones con resultados positivos (Keller *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2003; Enkerli *et al.*, 2004; Kessler *et al.*, 2004). En México, la posibilidad del manejo de esta plaga mediante hongos entomopatógenos, hasta donde se conoce, no se ha evaluado de manera precisa, por lo que se desconoce el potencial real de estos microorganismos. Considerando que el daño por estos insectos es ocasionado principalmente por las

larvas, las cuales se encuentran en el suelo alimentándose de las raíces de las plantas, la interacción con poblaciones de hongos entomopatógenos presentes en el mismo sistema es posible. Con base en lo anterior, se desarrolló esta investigación en la cual se buscó identificar la diversidad y abundancia de especies de hongos entomopatógenos infectando a larvas de gallina ciega en el estado de Guanajuato, México, con el objetivo de incrementar conocimientos de la ecología de estos microorganismos, generar información básica que describiera los factores que pueden afectar la persistencia de estos hongos y que puedan modificar la relación parasítica con larvas de gallina ciega.

## **1.2 Hongos entomopatógenos**

Los hongos contienen una amplia diversidad de taxones, los cuales presentan ciertas propiedades, requerimientos y ocupan un lugar en diversos nichos ecológicos donde se encuentran también algunos artrópodos (Boucias y Pendland, 1998). Los hongos entomopatógenos, los cuales viven a expensas de insectos de diferentes órdenes en forma natural, representan un grupo importante, desde el punto de vista ecológico y económico. La mayoría de los hongos entomopatógenos se encuentran en las divisiones Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Roy *et al.*, 2006). Los hongos poseen paredes celulares que se componen de  $\beta$ -glucanos y producen esporas no móviles asexuales (conidios), estos son unicelulares o filamentosos, acuáticos o terrestres. Los hongos entomopatógenos que están dentro de Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota no forman esporas móviles y principalmente son terrestres. Los conidios son las unidades infectivas y penetran al cuerpo del insecto produciéndole disturbios a nivel digestivo, nervioso, muscular, respiratorio, excretor, etc., haciendo que el insecto se enferme, deje de alimentarse y posteriormente muera (Lacey y Kaya, 2000). El mecanismo de acción se divide en tres fases: la primera es la adhesión seguido de la germinación de la espora sobre la cutícula del insecto; la segunda fase es la penetración en el hemocele y la tercera la invasión o desarrollo del hongo sobre órganos y tejidos, la cual concluye con la muerte del insecto (Alean,

2003). Se ha mencionado que existen características físicas y químicas que presentan los insectos, como los carbohidratos que están en las proteínas cuticulares mismas que dan paso a la germinación y la formación de una cubierta mucilaginosa que hidrata y protege a la espora de polifenoles tóxicos y enzimas secretadas por el sistema inmune del insecto (Kachatourians, 1996). Por otro lado, también se ha descrito que desde la penetración de la cutícula hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos inhiben el crecimiento del insecto y se activa el sistema inmune a través de procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (St.leger y Roberts, 1997). Los hongos presentan diferentes estrategias para evitar el sistema de defensa de los insectos como cambios en la pared celular y producción de toxinas (Khachatourians, 1991). Actualmente se conocen más de 700 especies de hongos pero se han usado alrededor de 10 especies en el control biológico de insectos (Hajeck y St Leger, 199; Roy *et al.*, 2006). La mayoría de las especies de hongos se encuentran en las divisiones Ascomycota y Zygomycota (Cuadro 1).

Cuadro1. Géneros importantes de hongos entomopatógenos

<b>División</b>	<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Genero</b>
Zygomycota	Zygomycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae	<i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Eryniopsis</i> <i>Furia</i> <i>Massospora</i> <i>Strongwellsea</i> <i>Pandora</i> <i>Tarichium</i> <i>Zoophtora</i>
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Neozygitaceae Clavicipitaceae	<i>Neozygites</i> <i>Beauveria</i> <i>Cordyceps</i> <i>Cordycepioideus</i> <i>Lecanicillium</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i>

Referencia: Roy *et al.* 2006

### 1.3 Factores que afectan la diversidad y distribución de los hongos

La diversidad y abundancia de los hongos entomopatógenos es afectada por factores bióticos y abióticos ya que pueden disminuir la capacidad de sobrevivir, propagarse e infectar a su hospedante; entre los factores más importantes se mencionan la radiación UV, temperaturas altas y desecación (Cardona, 1998; Gottel *et al.*, 2000).

Los conidios son susceptibles a la radiación ultravioleta B (UVB) cuya porción del espectro solar es de 295 a 320 nm, afectando la persistencia de estos en el sustrato donde se encuentren (Goettel *et al.*, 2000).

Con respecto a la temperatura, la mayoría de los entomopatógenos tienen un amplio rango de tolerancia a temperaturas, pero para crecer y esporular generalmente está entre 20 y 30 °C, en la mayoría de las especies los conidios pueden sobrevivir a temperaturas bajo cero, lo cual facilita su almacenamiento por largos periodos en laboratorio a -20 °C o en nitrógeno líquido a -196 °C. Algunas especies pueden tolerar temperaturas altas de hasta 40 °C, pero sólo por periodos cortos (Gottel *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente, la humedad es importante para la esporulación y germinación de los conidios, los hongos requieren de una humedad alta para iniciar una epizootia natural (Gottel *et al.*, 2000).

El impacto de la lluvia en la persistencia de conidios sobre el insecto y en follaje se ha estudiado extensamente, debido a que remueve los conidios del integumento del insecto adulto o larva; sin embargo, medir los efectos de la lluvia en la persistencia de estos hongos en campo se dificulta por la confusión de variables, la rápida desactivación del conidio por radiación solar no permite estimar un efecto real de la precipitación en la persistencia de los conidios a través del tiempo (Goettel e Inglis, 1997). También se ha determinado que el tipo de suelo puede tener un efecto en la diversidad y abundancia de estos microorganismos, ya que *B. bassiana* se ha reportado con mayor abundancia en suelos arcillosos, con un pH alto y bajo contenido de materia orgánica, siendo estas dos últimas variables importantes en la presencia de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Quesada *et al.*, 2007).

## 1.4 Complejo gallinas ciegas (Coleóptera: Scarabaeidae) Melolonthidae

Las larvas comúnmente denominadas “gallinas ciegas” viven en el suelo, alimentándose de materia en descomposición, heces, hojarasca, troncos podridos etc. Las especies más importantes se encuentran en la familia Melolonthidae con más de 890 especies reportadas para México (Morón, 2001). Este grupo, considerado como rizófago en su mayoría, son plagas de alto impacto económico en Latinoamérica y ha sido reportado en más de 40 cultivos, donde provoca amarillamiento de las plantas hasta la pérdida total de la cosecha. En el estado de Guanajuato se ha reportado a las especies *Phyllophaga ravidata*, *P. vetula*, *P. polyphylla*, *Cyclocephala lunulata*, *C. comata*, *C. lurida cohahuilae*, *Macroductylus mexicanus* y *Anomala spp*; estos géneros presentan una generación anual donde el género con mayor distribución en el Estado de Guanajuato es *Cyclocephala* (Marín y Bujanos, 2003).

### 1.4.1 Daños y control de larvas de gallinas ciegas

En estudios realizados por Ramírez y Castro (2000) en cultivo de maíz de temporal ellos observaron que el daño comienza en plantas con 5 hojas, y cuando la planta llega a 10 hojas las larvas están cerca de la raíz pero aún no se manifiesta el daño externo, éste comienza a verse cuando la planta está en etapa reproductiva, generalmente por manchones debido a que no tiene una ovoposición homogénea, cada manchón presenta superficies alrededor de 27.36 m<sup>2</sup> con 32 matas caídas o de 139.84 m<sup>2</sup> con 154 matas caídas. El desarrollo de las plantas afectadas es pobre, con la presencia de síntomas de deficiencia de agua y nutrientes; estas plantas se vuelven susceptibles al acame, no rinden bien y posteriormente mueren; los daños se visualizan por manchones hasta eliminar una siembra completa, mientras que los adultos se alimentan de follaje de árboles y otras plantas (Cruz *et. al.*, 2001)

#### 1.4.2 Control Microbiano de larvas de gallina ciega

En el control de la gallina ciega se han empleado diversidad de métodos como el cultural, químico y genético; sin embargo, estas prácticas no han sido eficaces debido al comportamiento de las larvas, específicamente a sus hábitos subterráneos, estacionalidad y patrón de ataque. El uso de microorganismos entomopatógenos presentes en el mismo hábitat que el insecto, podría ser una opción para su control. Dentro de los principales patógenos de *Phyllophaga* y otros escarabeidos se encuentran las bacterias formadoras y no formadoras de esporas como *Bacillus cereus* (Flankland), *Clostridium* sp., *B. laterosporus* (Poprawski y Yule, 1991), aunque la bacteria más exitosa y estudiada contra larvas de coleópteros es *Paenibacillus popilliae* (Dutki) catalogada como patógeno obligado que provoca la enfermedad lechosa; otros microorganismos corresponden a hongos del grupo Ascomycetes como *Isaria*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Beauveria* y *Metarhizium*, los cuales han sido reportados infectando larvas de escarabeidos. Los hongos entomopatógenos *Beauveria* y *Metarhizium* son considerados como saprófitos del suelo y se pueden encontrar en hábitats junto a pastizales (Meyling y Elinberg, 2007). *Beauveria* se encuentra más asociada con hábitats sombreados, no cultivados y en suelos con setos (Bidochka, et al., 1998), también se han encontrado formando asociaciones con raíces para sobrevivir mejor (Bruck, 2005). Otros microorganismos encontrados son los nematodos de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae, estos están en simbiosis con las bacterias *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* respectivamente, al ser liberadas en el hospedante provocan septicemia y la muerte del hospedero, una ventaja de los nematodos es su movilidad y por ende alta capacidad de búsqueda; también se han encontrado algunos protozoarios del grupo Microsporidia, Eucoccidiida, Neogregarinida y Eugregarinida, pero se conoce poco sobre su ciclo de vida y su efectividad sobre poblaciones de *Phyllophaga* (Hidalgo, 2001).



#### **1.4.2.1 Descripción general de *Beauveria***

Las especies del género *Beauveria* son cosmopolitas, pertenecen al orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae. Se encuentra de forma natural infectando a más de 750 especies de insectos (Motta y Murcia, 2011). En 1912 Vuillemin describió formalmente el género *Beauveria* llamado primero como *Botrytis* y es en 1914 cuando la reconoce J. Beauverie nombrándole *Beauveria* o enfermedad de la muscardina, cuya reproducción es por medio de conidios conocida como su fase asexual. El reconocimiento de su fase sexual se ha realizado por métodos moleculares, sin embargo, el análisis taxonómico ha mostrado diversos problemas en la identificación y nomenclatura de sus especies. *Beauveria* se identifica morfológicamente por sus células conidiogenas en grupos verticilados, estas son cortas a globosas en forma de botella y producen una sucesión de una sola célula sésil, hialina, holoblástica. Este hongo se ha comparado con otros géneros (*Acrodontium*, *Isaria*, *Tritirachium* y *Tolypocladium* por sus similitud en la célula conidiogena, pero los han separado por estudios de las regiones ITS (Rehner y Buckley, 2005). El micelio de *Beauveria* es de color blanco al igual que sus conidios, de aspecto lanoso, algunos aislamientos pueden producir una pigmentación amarilla, pero la cantidad de conidios en un cultivo puede ser muy abundante creando una apariencia blanquecina, harinosa de aspecto polvoso en la superficie de la colonia; tradicionalmente, la forma del conidio se ha utilizado para la separación de especies, estos varían de globosos, cilíndricos, reniformes a vermiformes, su tamaño es de 1.8 a 6.0  $\mu\text{m}$ , y en algunas especies de América del Sur los conidios son verrucosos (Rehner y Buckley, 2005).

#### **1.4.2.2 Descripción general del género *Metarhizium***

Las especies de *Metarhizium* son conocidas por infectar más de 200 especies de insectos. Estas forman conidióforos ramificados, donde el conidio inicial es producido por el conidióforo en una abstricción simple en la parte distal, los conidios crecen en los conidióforos en cadenas densas y adheridas unas con otras para formar masas

prismáticas en columnas. Los conidios jóvenes son blancos, al madurar se tornan color verde oscuro; para *M. anisopliae*, los conidios son de forma cilíndrica u ovals, angostos en la parte media, truncados en ambos lados. Esta especie forma dos variedades *M. anisopliae* var *anisopliae* con conidios de 3.5-9.0  $\mu$  de largo entre 5.0-8.0  $\mu$  y *M. anisopliae* var. *major* (Johnston) Tulloch, los conidios miden de 9.0-18.0  $\mu$  de largo entre 10-14  $\mu$ . En la actualidad, la mayoría de los estudios con especies de este género incluyen el papel de enzimas involucradas en la patogénesis así como su bioquímica, la modificación genética de aislamientos mediante la inserción de genes virulentos y estudios de la estructura de sus poblaciones. Este hongo infecta mediante mecanismos bioquímicos, donde los conidios se adhieren a la cutícula mediante mecanismos hidrofóbicos, y posteriormente produciendo una potente proteasa extracelular llamada Pr1 (quimoelastasa extracelular) que degrada la proteína de la cutícula (St. Leger *et al.*, 1988).

## 1.5 OBJETIVO

La presente investigación tuvo por objetivo estudiar la diversidad y estructura genética de poblaciones de hongos entomopatógenos infectando larvas de gallina ciega en el estado de Guanajuato, México.

Este objetivo se cumplió mediante los siguientes objetivos particulares:

1. Obtener aislamientos de hongos entomopatógenos infectando larvas de gallina ciega en diversas localidades del estado de Guanajuato.
2. Evaluar la susceptibilidad de larvas de *Phyllophaga polyphylla* y *Anomala cincta* hacia los aislamientos.
3. Identificar morfológica y molecularmente los aislamientos de hongos entomopatógenos
4. Determinar la variación genética y estructura de poblaciones de los aislamientos.

## 1.6 Literatura citada

Alean C., I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana, TESIS. Bogotá.

Bidochka M., J., J.E Karsperski and G. A. Wild. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperature and near-northern. Can. J. Bot. 76: 1198-1204.

Boucias D., G. and J.C. Pendland. 1998. Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic. Publ., Boston, 548 pp.

Bruck D., J. 2005. Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rizosphere: implications for pest management . Biol. Control. 32: 155-163

Cardona M., C. 1998. Entomología económica y manejo de plagas. Palmira: Universidad Nacional de Colombia. p.99

Cruz L., J., A., R.A. Castro A., S.C. Ramírez y H. Gómez 2001. Supresión manual de adultos de *Phyllophaga* spp. y *Anomala* spp. en maíz en México. Manejo integrado de Plagas (Costa Rica). 50:41-47.

Enkerli J., F. Widmer and S. Keller. 2004. Long-term persistence of *Beauveria brongniartii* starins applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. Biol. Control. 29: 115-123.

Fuxa J., R. and Y. Tanada. 1987. Epizootiology of Insect Diseases. Wiley Interscience Publ., NY: 555 pp.

Goettel M., S. and A. E. Hajek. 2000. Evaluation of nontarget effects of pathogens used for management of arthropods. *In*: Wajnber, E., Scott, J.K. and P.C. Quimby. Eds. Evaluating Indirect Ecological Effects of Biological Control. CAB International. Wallingford, UK. 81-97.

Goettel, M. S. and G.D.Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. *In*: Manual of Techniques in Insect Pathology. Ed Lawrence Lacey. Academic Press, San Diego California, USA. pp. 213-248.

Hajek A., E. and R. J St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-322.

Hidalgo, E. 2001. Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga* spp. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).60: 1-4

Khachatourians G.,G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. *In* The Mycota VI. Human and Animal Relationships, Howard/Miller eds. Springer-Verlag, Berlin. pp 331-364.

Khachatourians G., G.1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi.*In*: Arora, D. K, Ajello, L and K.G.Mukerji. Eds. Handbook of Applied Mycology v. 2: Humans, animals and insects. Dakker. Nueva York, EEUU. pp 613-661.

Keller S., C. Schweizer and P. Shah. 1999. Differential Susceptibility of Two *Melolontha* Populations to infections by the Fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 9:441-446.

Keller S., P. Kessler and C. Schweizer. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol.* 48: 307-319.

Kessler P., J. Enkerli., C. Schweizer and S. Keller. 2004. Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as a biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *Biocontrol*. 49:563-581.

Kessler P., H. Matzke and S. Keller. 2003. The effect of application time and soil factors on the occurrence of *Beauveria brongniartii* applied as a biological control agent in soil. *J. of Invertebr. Pathol.*84:15-23.

Lacey L., A. and H. K. Kaya. 2000. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests.* Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 911 pp.

Marín-Jarillo A. y R. Bujanos-Muñiz. 2008. Especies del complejo “gallina ciega” del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. *Agricultura Técnica en México*. 34: 349-355.

Meyling N.,V. and J. Elinberg. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperature agroecosystems: Potential for conservation biological control. *J. Biol. Con.* 43:145-155.

Motta D., A. y B. Murcia. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua. An Interdisciplinary Journal of Applied Scien.* 6: 77-90.

Morón M., A. 2001. Larvas de escarabajos del suelo en México (Coleoptera: Melolonthidae). *In: Fragoso, C y P. Reyes- Castillo (Eds). Diversidad, función y manejo de la biota edáfica en México. Acta Zoológica Mexicana.* 1:111-130.

Poprawski T., J. and W.N. Yule. 1991. Incidence of fungi in natural populations of *Phyllophaga* spp. and susceptibility of *Phyllophaga anxia* (LeConte) (Col.,

Scarabaeidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina). *Entomology*. 112: pp. 359-365.

Quesada M., E., J.A. Navas C., A.A. Maranhao E., U.A Ortiz and C. A. Santiago. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*. 111: 947-966.

Ramirez-Salinas, C. y A. E. Castro-Ramirez. 2000. El complejo "Gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de maíz, en el madroñal, municipio de Amatengo del Valle, Chiapas México. *Acta Zoológica Mexicana* No.79. 17-41.

Rehner S., A. and E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*. 97: 84-98.

Roy H.,E., D. Steinkraus., E. Eilenberg, Hajek and J.K. Pell. 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. *Annu.Entomol.* 51:331-357.

Sevim A., I. Demir, R.A. Humber and Z. Demirbag. 2010. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. *BioControl*. 55:279-297.

St. Leger R., J. and D.W. Roberts. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.* 15: 83-87.

St. Leger R., J., P.K. Durrands., A.K. Charnley and R.M. Cooper. 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogen *M. anisopliae*. *Microbiol* 150: 413-416.

## **CAPÍTULO II. OBTENCIÓN DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS A PARTIR DE LARVAS DE GALLINA CIEGA**

### **2.1 Introducción**

El control microbiano es considerado una alternativa de gran importancia para el control de plagas que resulta inofensivo al ambiente, al hombre y animales (James y Elzen, 2001). El control químico de plagas de hábitos subterráneos o ambientes crípticos, en general, es considerado de baja eficiencia (Loera, *et al.*, 2010), además que su uso excesivo puede producir contaminación del suelo, mantos freáticos etc, por lo que es deseable una reducción en su uso tratando de adoptar medidas de control alternativas como el uso de enemigos naturales, entre estos se encuentra el uso de hongos entomopatógenos *Metarhizium* spp y *Beauveria* spp, los cuales se encuentran distribuidos en el mundo y se consideran seguros para el ambiente (Goettel e Inglis, 1997). La búsqueda y evaluación de nuevos aislamientos de hongos entomopatógenos en insectos de importancia económica, puede proporcionar mayor diversidad genética para el control biológico. Para realizarlo las pruebas consisten en: 1. obtener aislamientos a partir de insectos muertos con la sintomatología característica del ataque de hongos, 2. obtener cultivos puros para identificarlos de acuerdo a su crecimiento, morfología, disposición de células conidiogenas y conidios, 3. seguido de pruebas de virulencia (Humber, 1997). Con la búsqueda de aislamientos nativos se ayuda a establecer sistemas de producción menos degradantes para el ambiente y más seguros para el consumidor.

En el estado de Guanajuato, 60% del territorio es de uso agrícola y de ese porcentaje se deriva 80% para cultivar maíz, sorgo, trigo y crucíferas, donde la gallina ciega, ha sido un gran problema, las larvas se alimentan de las raíces, los daños favorecen la penetración de hongos, bacterias y otros patógenos que ocasionan severas lesiones que originan la muerte de la planta (Cortés y Rivera 2007). En México el complejo de esta plaga representa un serio problema en diferentes regiones geográficas. Dentro de

los géneros más importantes del complejo de gallina ciega se encuentra *Anomala* y *Phyllophaga*, de esta última para México se han descrito 285 especies y de estas sólo el 10% se asocia a cultivos agrícolas (Morón, 2010). *Phyllophaga polyphylla* (Bates) es una de las especies más importantes (Marín y Bujanos, 2008), esto ha llevado a la búsqueda de alternativas de control de esta plaga.

## 2.2. Material y Métodos

Se recolectaron larvas de gallina ciega durante octubre de 2007 en siete localidades del estado de Guanajuato en tres diferentes municipios (Cuadro 2).

Cuadro 2. Localidades de recolecta, octubre 2007, en el estado de Guanajuato, México.

Número	Localidad	Municipio	Cultivo
1	Jalpilla	Comonfort	Maíz (temporal) <sup>+</sup>
2	Puruagua	Jerécuaro	Maíz (temporal) <sup>+</sup>
3	San Lorenzo	Jerécuaro	Sorgo (Baldío) <sup>++</sup>
4	Tierra Negra	Penjamo	Maíz (temporal) <sup>+</sup>
5	Mesa de Méndez	Penjamo	Garbanzo
6	San José de Las Sabinas	Penjamo	Sorgo
7	Laguna verde	Penjamo	Maíz (temporal) <sup>+</sup>

+ Cultivo encontrado en el lugar

++ Rastrojos del cultivo anterior

### 2.2.1 Obtención de aislamientos

Larvas aparentemente sanas se recolectaron en las diferentes localidades seleccionadas. Estas fueron recolectadas manualmente y depositadas en hieleras con peat moss (Growing Mix ®, Canadá) las larvas se trasladaron al Laboratorio donde fueron identificadas a género por medio de la presencia de la palidia en el último segmento abdominal y la apertura anal (Morón, 1986; Ritche, 1966), no se identificaron a nivel de especies debido a que esta debe ser realizada con adultos (Morón, 1986). Las larvas fueron colocadas de forma individual en vasos de plástico con peat moss humedecido con agua estéril; los vasos fueron incubados a 25 °C



durante 30 días, y se revisaron cada 7 días. Las larvas con la presencia de hongos fueron limpiadas con un pincel para quitar los residuos de peat moss y colocadas en alcohol al 70% por un minuto, en seguida se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante cinco minutos, después se lavaron con una solución estéril de Tween 80 al 0.03%, para retirar el exceso de humedad las larvas se colocaron sobre un papel filtro estéril Whatman No. 4. Una vez secas, se disectó una sección del tórax y esta se dividió en cinco partes, éstas se colocaron distribuidas en una caja de Petri con medio de cultivo ADS (Agar Dextrosa Sabourad). Una vez que se desarrollaron las cinco colonias, se seleccionó una y se transfirió a otra caja con medio ADS. Paralelamente, en algunas localidades se encontraron larvas de gallina ciega ya infectadas por un hongo, las cuales no pudieron ser identificadas, pero el hongo fue aislado siguiendo la misma metodología.

#### **2.2.1.1 Obtención de cultivos monospóricos**

El procedimiento de obtención de cultivos monospóricos fue el mismo para todos los aislamientos. De un cultivo con 20 días de incubación, se tomó una cantidad no determinada de conidios y se colocaron dentro de un frasco vial con 5 mL de Tween 80 al 0.03%, de esta suspensión se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L y se depositaron en cajas de Petri con agar-agua al 1.5% y se distribuyeron con una varilla de vidrio en forma de L. Posteriormente se incubaron 24 h y se observaron en el microscopio para comprobar la germinación de los conidios, en condiciones estériles se tomó un conidio germinado y se colocó en una placa de ADS y se incubó a 25 °C durante 15 días en completa oscuridad.

#### **2.2.1.2 Preservación de aislamientos**

Aislamientos originales y su versión monospórica se criopreservaron con el mismo procedimiento. De una colonia con 20 días de incubación, se tomaron cuatro círculos de 5 mm de diámetro, estos fueron colocados dentro de crio-viales de 2 mL de volumen

(CORNING ®) conteniendo 1 mL de glicerol al 10% estéril, el cual después de depositar los círculos de hongo, se ajustó a un volumen final de 1.8 mL. Posteriormente, los crio-viales se colocaron en cajas etiquetadas dentro de un ultracongelador a -80°C.

### **2.3 Evaluación de la capacidad de infección de aislamientos obtenidos en larvas de *Phyllophaga polyphylla* y *Anomala cincta***

Con este experimento se pretendía confirmar la capacidad infectiva de los aislamientos de larvas de gallina ciega. Para esto se, se utilizaron larvas de *Phyllophaga polyphylla* y *Anomala cincta*, especies que fueron más abundantes en algunas zonas de recolecta. Larvas sanas de ambas especies se recolectaron durante septiembre y octubre de 2008 en la localidad de San Lorenzo, Jerécuaro, Guanajuato. Las larvas se separaron por género y se colocaron de manera individual en envases de plástico transparente de 100 mL de volumen con peat moss. Para alimentar a cada larva dentro de cada envase se depositó una rodaja de zanahoria lavada y desinfectada con cloro al 0.1% .Los recipientes se conservaron en el laboratorio a temperatura ambiente y se revisaron cada ocho días, se mantuvo la humedad del sustrato y la alimentación, las larvas se mantuvieron bajo observación durante 30 días antes de ser utilizadas en el experimento.

#### **2.3.1 Aislamientos de hongos entomopatógenos**

De los 17 aislamientos recolectados de *Beauveria* se utilizaron los aislamientos de *Beauveria* codificados como GC03, GC07, GC09. GC011, GC012, GC013, GC014, GC015, GC016, GC18 y GC20, se incluyó el aislamiento Bb88 como referencia, los aislamientos de *Metarhizium* que se empleados fueron MGC01 y MGC02. También se incluyeron los aislamientos MGC06 y MGC07 proporcionados por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, los cuales se usaron como referencia.

### 2.3.1.1 Suspensión de conidios

Las suspensiones se realizaron a partir de cultivos monospóricos de 15 días posteriores a su cultivo en medio de crecimiento ADS. Los conidios y micelio se removieron de tres a cinco cajas de Petri por aislamiento, para ello se usó una espátula metálica y esto se colocó en un tubo para centrifuga de 50 mL de volumen y se agregaron 20 mL de Tween 80 estéril al 0.03%. Cada tubo se agitó con un Vortex durante 5 minutos, y el contenido se filtró a otro tubo de centrifuga limpio a través de una doble capa de pañalina esterilizada contenida en un embudo de cristal de 5 cm de diámetro. Los tubos con las suspensiones concentradas de conidios se mantuvieron a 4°C por un periodo no mayor a 24 h hasta su uso. De cada suspensión de conidios, se tomó una alícuota de 10 µL y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL de volumen con 990 µL de Tween 80 al 0.03%. Estas suspensiones se utilizaron para estimar la concentración de conidios por mL en una cámara de Neubauer. La concentración de conidios utilizada en el experimento fue de  $1 \times 10^8$  conidios /mL en un volumen final de 100 mL.

### 2.3.2 Establecimiento del experimento

La inoculación de las larvas de *Phyllophaga* y *Anomala* se realizó con la misma metodología. Se formaron grupos de 10 larvas para el caso de *P. polyphylla* y 12 larvas para el caso de *A. cincta*, éstas se inocularon en suspensiones de  $1 \times 10^8$  conidios /mL en 100 mL, dentro de la campana de flujo laminar. Las larvas se colocaron dentro de un embudo de porcelana de 15 cm de diámetro con dos círculos de papel filtro Whatman No.1 de 15 cm de diámetro en la base del embudo, éste se conectó a un matraz kitasato y este último a una bomba de vacío. La suspensión de conidios fue vertida en el embudo conteniendo las larvas y éstas se mantuvieron en la suspensión de conidios durante 20 segundos. Una vez transcurrido el tiempo de inoculación, la suspensión se retiró mediante succión por medio de la bomba de vacío. Las larvas fueron transferidas a placas de cultivo de tejidos con 12 orificios, las cuales contenían un círculo de papel

filtro Whatman No. 1 de 2 cm de diámetro, éste estaba humedecido con 80 µL de agua destilada estéril y una rodaja de zanahoria como alimento. Las larvas testigo para cada género fueron expuestas únicamente a 100 mL de Tween 80 al 0.03%, durante 20 segundos. Todo el material experimental se incubó a 25 °C en total oscuridad durante 30 días. La mortalidad de las larvas se registró cada tres días.

### **2.3.2.1 Análisis de datos**

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones en el caso de *Phyllophaga*. Para el caso de *Anomala* se realizaron únicamente dos repeticiones, esto debido a la baja presencia de larvas de esta especie en el campo durante las fechas de recolecta. El testigo se empleó para verificar que no existió contaminación cruzada, y para corregir mortalidad en caso de tener larvas muertas en el tratamiento testigo. El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de regresión logística con el programa GenStat V. 8.1, donde primeramente se comparó la mortalidad en el testigo contra todos los demás tratamientos combinados, posteriormente se comparó la mortalidad entre los tratamientos. El análisis únicamente se realizó para las larvas de *Phyllophaga* por tener el mínimo requerido de repeticiones.

## 2.4. Resultados

### 2.4.1 Búsqueda de aislamientos nativos.

Se recolectaron un total de 385 larvas de gallina ciega incluyendo sanas e infectadas de campo. A partir de estas larvas, se obtuvieron 20 aislamientos de *Beauveria* y dos de *Metarhizium* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Lugares seleccionados para la colecta

Municipio	Localidad	Cultivo	Género de larvas	Larvas infectadas ( <i>Beauveria</i> )	Larvas infectadas ( <i>Metarhizium</i> )	Total de larvas
Comonfort	Jalpilla	maíz	<i>Phyllophaga</i>	0	0	3
Jerécuaro	Puruagua	maíz	<i>Phyllophaga</i> <i>Anomala</i> <i>Macroductylus</i>	0	2	35
Jerécuaro	San Lorenzo	sorgo y baldío	<i>Phyllophaga</i> <i>Cyclocephala</i> <i>Macroductylus</i> <i>Diplotaxis</i>	6	0	135
Penjamo	Tierra Negra	maíz	<i>Phyllophaga</i> <i>Cyclocephala</i> <i>Diplotaxis</i>	6	0	65
Penjamo	Mesa de Méndez	garbanzo	<i>Phyllophaga</i> <i>Cyclocephala</i>	0	0	31
Penjamo	San José de Las Sabinas	sorgo	<i>Phyllophaga</i>	7	0	75
Penjamo	Laguna Verde	maíz	<i>Phyllophaga</i> <i>Diplotaxis</i> <i>Cyclocephala</i>	1	0	41

## 2.4.2 Evaluación de la capacidad de infección de los aislamientos

Los resultados de infección mostraron diferencias significativas entre mortalidad de larvas de *P. polyphylla* entre el tratamiento testigo y los tratamientos con hongos combinados ( $F_{1,32} = 11.59$ ,  $P=0.002$ ), esto debido a que no se registró mortalidad en los tratamientos control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre aislamientos ( $F_{15,32}=1.77$ ,  $P=0.086$ ). Las proporciones de infección logradas por los aislamientos nunca fueron mayores a 0.5 (Figura 1).

Para el caso de las larvas de *Anomala*, es difícil tener una conclusión definitiva por qué no se dispone de un análisis formal, sin embargo, es evidente que los aislamientos de *Metarhizium* causaron infecciones más altas comparadas con los aislamientos de *Beauveria* (Figura 2).

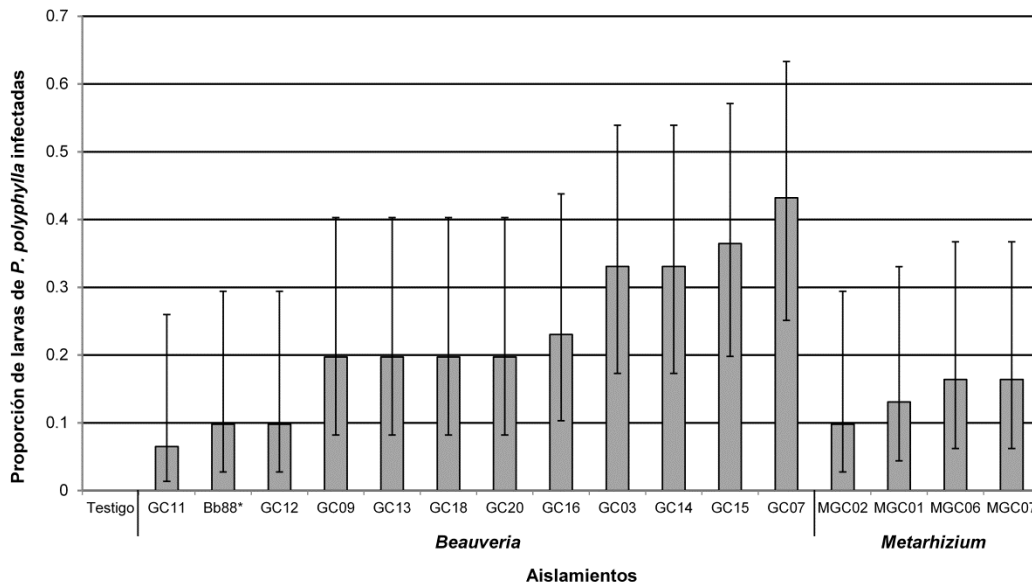


Figura 1. Proporciones de infección logradas en larvas de *Phyllophaga polyphylla*, inoculadas con aislamientos de *Beauveria* y *Metarhizium*. \* Aislamiento incluido como referencia. Las barras de error representan límites de confianza estimadas con un 95% de confiabilidad transformada de la escala logística.

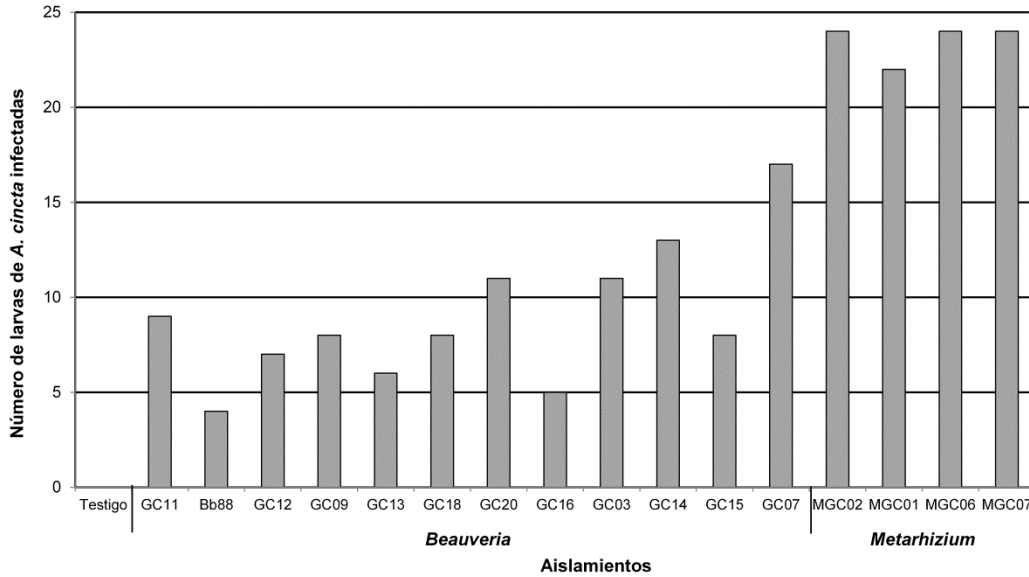


Figura 2. Número de larvas *A. cincta* infectadas con los aislamientos de *Beauveria* y *Metarhizium*.

## 2.5 Discusión

Los resultados mostraron una mayor abundancia de aislamientos del género *Beauveria* comparado con *Metarhizium*. Las especies del género *Beauveria* son comunes en suelos y tienen una distribución cosmopolita. Pueden infectar a hospedantes termofílicos o de climas cálidos, así como en climas fríos donde se han encontrado infectando acrídidos (Evans, 1982). Las especies del género *Metarhizium* son más comunes en pastizales no perturbados, pero aún no se sabe exactamente si el micelio sobrevive en restos de insectos como saprófito, o permanece latente en el suelo en espera de un insecto susceptible (Inglis *et al.*, 2001). También se ha sugerido que las especies de *Metarhizium* están relacionadas con el tipo de sustrato orgánico que se encuentre en la capa superior del suelo (Dix y Webster, 1995). La radiación solar y la temperatura juegan un papel importante en la sobrevivencia de *Metarhizium*, ya que se ha encontrado que conidios de aislamientos de *Metarhizium* pueden tolerar hasta 40° C durante 12 h, y conforme aumenta la temperatura la viabilidad de los conidios se reduce a 50% (Rangel *et al.*, 2006). Existen reportes señalando que aislamientos de

latitudes más altas de entre 40° a 61° son más susceptibles a la temperatura (45°C) que los aislamientos que se encuentran en latitudes más bajas (con temperaturas de 19°C a 36°C). Se considera que se encontraron mayor cantidad de aislamientos de *Beauveria* debido a las condiciones climáticas de los sitios de recolecta que van de semicálidos a templados, que son los climas favorables para *Beauveria*, además, este género se encuentra asociado a raíces de plantas de maíz que fue el cultivo en los sitios de recolecta. Mientras que en el caso de los aislamientos de *Metarhizium* se considera que la poca abundancia se debe a que este género prefiere climas semisecos y suelos menos arcillosos, ya que los suelos de colecta fueron predominantemente arcillosos.

Las pruebas de susceptibilidad mostraron que el aislamiento BbGC07 fue el que provocó mayor índice de mortalidad en larvas de *Phyllophaga*, en comparación con el resto de los aislamientos de *Beauveria*, mientras que para el grupo de *Metarhizium* los aislamientos con mayor índice de mortalidad fueron MaGC06 y MaGC07. Con larvas de *Anomala* los promedios de mortalidad causados con *Beauveria* y *Metarhizium* fueron más altos en ambos grupos debido a que las larvas son más susceptibles, esto puede deberse a la asociación patógeno- hospedero, ya que se sabe que el insecto puede ejercer una presión de selección que favorece a ciertos genotipos del patógeno (St. Leger y Roberts, 1997); también se ha sugerido que la susceptibilidad se relaciona con los nutrimentos que estén presentes en el insecto, los cuales son medios de propagación, dispersión y persistencia de este tipo de hongos, y si los nutrimentos son los específicos (agua, luz y otros factores ambientales) inducen la activación de receptores en el patógeno para iniciar el proceso infectivo en el hospedero (Hajek, 1997).

Se ha sugerido que la exposición continua de larvas de *P. polyphylla* a poblaciones nativas de hongos entomopatógenos hace que se desarrolle cierta tolerancia en una infección (Hernández, 2010); sin embargo, con larvas de *A. cincta*, se encontró mayor susceptibilidad con mortalidades cercanas al 100% ocasionados por aislamientos de *Metarhizium*, es difícil tener una explicación del porque dos especies que comparten el mismo sistema, tienen susceptibilidades diferentes hacia la infección de hongos entomopatógenos; no obstante, esto demuestra que la relación de hongos



entomopatógenos con el complejo de larvas de gallina ciega requiere de mayor investigación.

## 2.6 Literatura citada

Cortés B., E. y J. G. Rivera R. 2007. Silo hermético para el control de plagas de granos almacenados en Guanajuato, México. *Agri. Téc.* 33(3): 231-239.

Dix N., J. and J. Webster. 1995. *Fungal ecology*. Chapman & Hall, Cambridge, Great Britain. 367

Evans H., C. 1982. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *Ecol. Entomol.* 7:47-60.

Goettel M., S. and D.G. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. *In*: LA Lacey ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. California, USA, .213-249.

Hajek A., E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv. Microb. Ecol.* 15:193-249.

Hernández L., J. 2010. Virulencia de aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals) Vull. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch)(Ascomycetes: Hypocreales) en larvas de gallina ciegas(Coleóptera: Scarabaeidae) y su interacción con algunos factores bióticos y abióticos. Tesis. Maestría. Colegio de Postgraduados Texcoco,. Estado de México. 59p.

Humber R., A. 1997. Fungi-Identification. *In* *Manual of Techniques in Insect Pathology*, ed. L. Lacey. London: Academic Press. 153-185.

Inglis G., D., M.S.Goettel, T.M. Butt and H. Strasser. 2001. Use of hyphomycetous for managing insect pests: In: Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. pp 23-69.

James R., R. and G.W. Elzen, 2001. Antagonism between *Beauveria bassiana* and imidacloprid when combined for *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) control. *Econ. Entomol.* 94: 357–61.

Loera Gallardo J., J.F. Pérez Dominguez and L.A. Rodríguez-del-Bosque. 2010. Control Químico. In: Rodríguez-del-Bosque, L.A., Morón, M.A. (eds.) Plagas del Suelo. Mundi Prensa, México, pp. 197-214.

Marín J., A. y R. Bujanos-Muñiz. 2008. Especies del complejo “Gallina ciega” del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. *Agricultura Técnica en México.* 34: 349-355.

Morón M., A. 2010. Diversidad y distribución del complejo gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeoidea). In: Rodríguez del Bosque L. A., y M. A. Morón. Plagas del Suelo. pp. 41-64.

Morón M., A. 1986. El género *Phyllophaga* en México: morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera) Publ. 20, Instituto de Ecología, México.

Rangel D.,E. N., A.J. Anderson and D.W. Roberts. 2006. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yield conidia with increased UV-tolerance. *Invertebrate Pathology.* 93: 127-134.

Ritcher P., O. 1966. White grubs and their allies. A study of North American scarabaeoid larvae. Studies in entomology No. 4. Oregon State University Press, Corvallis, USA, p. 219.

St. Leger R., J. and D.W. Roberts. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. Trends Biotechnol. 15: 83-87.

## **CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE HONGOS**

### **3.1 Introducción**

Las técnicas de la genética molecular dirigidas a investigaciones ecológicas, combina aspectos de diversos campos como poblaciones, evolución genética, biodiversidad, biología de la conservación, comportamiento ecológico e interacciones hábitat-especies (Meyling y Hajek, 2010). En este campo las principales herramientas de ecología molecular desarrollados a partir de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y esto ha facilitado el desarrollo de nuevas investigaciones, ya que se permite la amplificación específica de regiones de ADN o fragmentos basados en el uso de oligonucleótidos complementarios a las regiones que flanquean el objetivo de amplificación (Enkerli y Widmer, 2010). Estas investigaciones se han aplicado en varios aspectos ecológicos de los hongos entomopatógenos y han mejorado el conocimiento de los ciclos biológicos de varias especies, así como características de sus poblaciones, la relación de su estructura genética, tipo de hábitat y relación con su hospedante (Enkerli y Widmer, 2010). En este capítulo se utilizaron las medidas de los conidios como característica morfológica de los aislamientos y el uso de técnicas moleculares para corroborar la identificación de los aislamientos en estudio.

### **3.2 Uso de Técnicas Moleculares en la determinación taxonómica**

Las técnicas moleculares son consideradas entre las tecnologías de mayor impacto, revolucionando los estudios genéticos debido a sus múltiples ventajas con respecto a las morfológicas (Macias *et al.*, 2006). Los métodos de secuenciación se destacan por su amplia lista de genes utilizados para estudios de identificación y/o filogenia, los más

destacados son los que codifican para ARN ribosómico (ADNr) estos forman eslabones separados por regiones no codificantes como los ITS (Espacios Transcritos Internos por sus siglas en ingles) y el espaciador intergénico (IGS) (Butler y Metzzenberg, 1989). En algunos casos los datos proporcionados por estas regiones no son suficientes para determinar especies filogenéticamente próximas, por lo que se buscan otros genes que sean estructurales como la  $\beta$ -tubulina (TUB y BT2), la actina (ACT), la quitina sintasa (CHS), el factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ), la calmodulina (CAL) entre otros, estos genes o fragmentos de ellos, se utilizan para realizar estudios filogenéticos (Perdomo, 2011). En el caso de hongos entomopatógenos la herramienta más común para identificar a *Beauveria* y *Metarhizium* es por las características morfológicas de los conidios, pero con la ayuda de estudios moleculares se han hecho más precisas las determinaciones taxonómicas. Para el caso de *Beauveria* se ha confirmado que existe una alta diversidad genotípica, Rehner *et al.*, (2011) realizaron una evaluación taxonómica del género basado en un análisis filogenético multiloci, ésta incluyó cepas tipo para actualizar especies ya reconocidas y describir nuevas especies. Estos autores, basándose en secuencias parciales de los genes RPB1, RPB2, TEF y la región intergénica nuclear Bloc, estudiaron la diversidad de especies dentro del género *Beauveria*, tipificaron a *B. bassiana* y *B. brongniartii* y además agregaron seis especies nuevas. En el caso de *Metarhizium* Bischoff *et al.*, (2009) utilizaron regiones de secuencias parciales de los genes EF-1 $\alpha$ , RPB1, RPB2 y  $\beta$ -tubulina, para evaluar las relaciones filogenéticas dentro del complejo *Metarhizium anisopliae* y separar las especies donde la región 5' de el EF-1 $\alpha$  tuvo el mayor soporte de información de la variación de nucleótidos para separar clados y como consecuencia especies, estos autores propusieron reconocer la clasificación de especies *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum* stat. nov., *M. lepidiotae* stat. nov., y *M. majus* stat. nov., también describieron otras especies como *M. globosum*, *M. robertsii* y *M. brunneum*, finalmente demostraron que *M. taii* es una sinonimia de *M. guizhouense*.

### 3.2.1 Espacios Transcritos Internos (ITS-PCR)

El ARN ribosómico nuclear se ha empleado con fines taxonómicos y filogenéticos, debido a que el ADN<sub>r</sub> es una unidad que se repite de manera consecutiva, donde cada unidad se compone de una copia de los tres genes más grandes (18S, 5.8S y 28S), estos están separados por los espaciadores internos transcritos (ITS) y este a su vez está separado por los espaciadores intergénicos no transcritos (IGS). Los espaciadores transcritos son dos regiones del ADN que se transcriben y están presentes en el pre-ARN<sub>r</sub>, pero consecutivamente se eliminan y no aparecen en el producto ribosómico final. El gen 5.8S está típicamente flanqueado por los dos espaciadores transcritos, ITS I e ITS II, que lo separan de los genes 18S y 28S, respectivamente. El orden de los genes está universalmente conservado, excepto del gen 5.8S, que puede estar o no entre las unidades de repetición. Las regiones ITS no se correlacionan con ninguna morfología y no se conoce ninguna función para ellos. Su localización, rodeada por genes conservados, ha permitido su amplificación por PCR, la región completa ITS I-5.8S-ITS II es generalmente pequeña en hongos de aproximadamente 600-700 pb y es de fácil secuenciación (Ruiz, 2005).

### 3.2.2 Factor de Elongación-1 alfa (EF-1 $\alpha$ )

El gen Factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ) codifica para una proteína expresada de forma constitutiva abundante y es un elemento clave en la traducción de proteínas eucariotas, también actúa en la proteólisis dependiente de microtúbulos y la ruptura de la ubiquitina, además es regulador de la apoptosis programada (Ríos y Ríos, 2011). El EF-1 $\alpha$  se ha utilizado con éxito en estudios filogenéticos en hongos a nivel de especies (O'Donnell, *et al*, 1998); sin embargo, algunos autores señalan que puede tener algunas limitaciones en algunos grupos taxonómicos, específicamente los de alto rango taxonómico (orden y familia) (Tanabe *et al.*, 2004)

### 3.2.3 $\beta$ -tubulina

La familia de las tubulinas son proteínas globulares de 55 kDa (kDa= unidad de masa atómica unificada, medida de masa atómica y molecular) y está formada por tubulinas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ), las cuales comparten una identidad entre sus cadenas de aminoácidos de 35-40%, pero poca similitud con cualquier otra proteína. Las tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$  son las subunidades esenciales de los microtúbulos, y la tubulina es componente fundamental del centrosoma, también existen otras variantes menores que no están en todos los organismos eucariontes llamados tubulina delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) y zeta ( $\zeta$ ) (Little y Seehause, 1988).

Se han empleado fragmentos de los genes que codifican para esta proteínas para aclarar diferencias entre microsporidia y su estrecha relación con los hongos, las moléculas usadas fueron  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina, ambas proporcionaron novedosos datos a su clasificación y demostraron que existen 1200 especies descritas en más de 150 géneros (Vossbrinck y Debrunner-Vossbrinck, 2005). Los genes de tubulina de microsporidia y de todos los hongos excepto los Quitridios son muy discordantes debido a que carecen de nueve o 11 estructuras de microtúbulos, en consecuencia existen restricciones evolutivas entre microsporidia y en algunos hongos por lo que la filogenia con tubulina debe ser interpretada con gran cuidado, debido a que existe heterogeneidad entre taxones y se pueden interpretar de forma errónea en los árboles filogenéticos (Einax y Voigt, 2003).

### 3.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en el uso de moléculas iniciadoras específicas para la identificación de un gen o una secuencia de ADN en particular, estas moléculas reconocen una secuencia de oligonucleótidos específicos complementando a regiones altamente conservadas de tal forma que en la reacción de PCR se sintetiza el gen (Valadez y Kahl, 2000). En esta técnica se produce un proceso de desnaturalización,

hibridación y uno de síntesis de ADN que se repite una y otra vez a menudo de 25 a 35 veces produciendo un alto número de moléculas (Kreuzer y Massey, 2008).

La técnica de PCR es confiable por su alto rango de aplicaciones. El material de inicio para la PCR es ADN genómico conteniendo las secuencias a ser amplificadas. En este material de inicio, las cadenas son separadas por una mezcla de reacciones de temperaturas frías y calientes para que se unan los oligonucleótidos a los dos sitios de construcción específicos de la región blanco, uno en cada cadena; mientras que la *Taq* polimerasa sintetiza la nueva cadena de ADN complementaria extendiéndose más allá (en una distancia variable) a la posición del sitio de unión del oligonucleótido sobre la otra cadena de ADN; la mezcla de reacción se calienta nuevamente para separar la doble cadena original y sintetizar la nueva cadena de ADN, se forman cuatro sitios de unión disponibles para los oligonucleótidos, uno en cada uno de las dos bandas originales y en las dos bandas nuevas de ADN; mientras que la *Taq* polimerasa sintetiza las nuevas cadenas complementarias, pero la extensión de estas cadenas es limitada por las secuencias blanco, así las dos nuevas cadenas se forman exactamente en la región especificada por los oligonucleótidos. La PCR dirige la amplificación de las secuencias blanco formando fragmentos dobles continuos en cada ciclo de reacción (Watson *et al.*, 1998).

### **3.3. Material y Métodos**

#### **3.3.1 Identificación morfológica de los aislamientos**

Para la identificación a nivel de género se realizaron micro-cultivos. Estos fueron realizados en cajas Petri de 90 mm de diámetro con 15 mL de agar-agua al 1.5%, sobre la placa de agar-agua se colocó un portaobjetos estéril el cual contenía dos círculos de medio ADS de 1 cm de diámetro en cada extremo, cada uno de estos fue inoculado con conidios de cada aislamiento y se cubrieron con cubreobjetos estériles. Las preparaciones se incubaron a 25°C durante 7 días o hasta que se observó



esporulación del hongo inoculado. Posteriormente, los cubreobjetos fueron separados con mucho cuidado del círculo de ADS y se colocaron sobre una gota de azul de algodón y lactofenol. Las preparaciones se sellaron con esmalte para uñas y examinaron bajo el microscopio compuesto en el objetivo 40X. Todos los aislamientos se determinaron hasta género basándose en las características descritas por Humber (1997).

Para la identificación específica, en el caso de los aislamientos de *Beauveria*, se elaboraron preparaciones semi-permanentes colocando 10  $\mu$ L de una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/mL sobre un portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos y fueron selladas con esmalte para uñas. Mientras que para el género *Metarhizium* para cada aislamiento se realizaron preparaciones en seco por medio de un barrido de conidios sobre el portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos. Todas las muestras se observaron con el objetivo de 40X de un foto-microscopio III CARL ZEISS conectado a una cámara digital para microscopía PaxCam3. Se tomaron de 162 a 200 fotografías a cada preparación, estas fueron segmentadas con el programa GIMP Versión 2.6.11 y con el programa Image Tool para Windows 3.0 (Wilcox, 2002) se midió el largo y ancho de los conidios.

Los datos de las mediciones se procesaron con un Análisis de Componentes principales (ACP), las variables que se analizaron fueron largo, ancho, elongación y redondez de los conidios. Se utilizaron los programas SAS System Versión 9.00 para Windows para realizar el ACP y XLSTAT Versión 2008.7.03 para Windows para la realización de las gráficas.

### **3.3.2 Identificación molecular**

#### **3.3.2.1 Producción de micelio y extracción de ADN**

Para este estudio, se utilizaron todos los aislamientos en su versión de monóspóricos. Los aislamientos fueron inoculados en placas de ADS e incubados durante 15 días a 25 °C en oscuridad total. Posteriormente, a cada placa se le adiciono 10 mL de Tween 80 al 0.03% para suspender los conidios. De la suspensión resultante, se tomó 1 mL y

se depositó en matraces Erlenmeyer conteniendo 50 mL de medio líquido CDS (Caldo Dextrosa Sabourad). Los matraces con CDS inoculados fueron incubados en un agitador orbital a 120 rpm a una temperatura de 25 °C por un periodo de 3 a 5 días. Una vez crecido el micelio en el medio líquido, éste se separó del medio mediante filtración a través de un filtro de papel estéril Whatman No.1 con agua destilada estéril. El micelio obtenido se colocó en tubos viales a -20 °C; y se liofilizaron durante 24 h.

Para la extracción de ADN, de cada muestra liofilizada se pesaron entre 0.020 y 0.024 g en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL. Los tubos se colocaron dentro de un recipiente con NL (Nitrógeno Líquido) colocando una pequeña cantidad de NL dentro de cada tubo; se dejaron aproximadamente 5 min dentro del recipiente para posteriormente macerar cada muestra con un micropistilo (Daigger and Company Inc., Vermon Hills, 11, USA).

La extracción de ADN se realizó con el kit de extracción DNeasy® Plant Minikit DNA de QIAGEN siguiendo las recomendaciones del fabricante con las modificaciones realizadas por Fargues *et al.* (2002) al agregar 4 µL de RNA-asa y 6 µL de β-metacarptoetanol. Las muestras se agitaron en un vortex durante 30 s, después se colocaron en un Termoblock a 65°C por 10 min, se agitaron en el vortex cada 3 min durante 30 s, una vez transcurrido este tiempo se agregaron 20 µL de proteinasa K y se dejaron 60 min en el Termoblock a 65°C, se agitaron en el vortex cada 15 min durante 60 s y se siguieron los pasos del protocolo del kit. Se obtuvieron 100 µL de ADN de cada muestra el cual se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con bromuro de etidio con una concentración de 0.5µg/mL. La concentración del ADN se determinó en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA ®).

### **3.3.2.2 Amplificación de la región ITS**

La región ITS incluyendo el fragmento 5.8S se amplificó para todos los aislamientos utilizando los oligonucleótidos ITS5 (TCCTCCGCTTATTATTGATATGC) e ITS4 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.* 1990). La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen total de 30 µL, la cual contenía 0.1 mM de dNTP's, 0.13 mM

de cada oligonucleótido, 0.1 U de Taq DNA Polimerasa (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany) en 1X de buffer de PCR (Tris.Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8.7) y de 10-20 ng de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler™ (BIO-RAD Laboratories Inc.®, Hercules, CA, USA) el programa incluyó un ciclo inicial de 3 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 45 °C, 90 s a 72 °C y un ciclo de 5 min a 72 °C. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.1 µg·mL<sup>-1</sup>) para visualizar los fragmentos bajo la luz UV en un fotodocumentador.

### **3.3.2.3 Amplificación de una región Bt2 del gen β-tubulina**

Para la amplificación de esta región se utilizaron los oligonucleótidos Bt2a (GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC) y Bt2b (ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC) (Glass y Donalson, 1995). La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen total de 30 µl por tubo, la cual contenía, 0.2 mM de los oligonucleótidos (Eurofins MWG|Operon), 0.2 mM de dNTP's 0.1 U de Taq DNA Polimerasa (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany), contenidos en 1X de buffer de PCR (Tris.Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8.7), y 10-20 ng µl<sup>-1</sup> de DNA. El programa incluyó un ciclo inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 1.30 min a 94 °C, 1 min a 60 °C, 2 min a 72 °C y un ciclo de 5 min a 72 °C.

Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 3% en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio (0.1 µg·mL<sup>-1</sup>).

### **3.3.2.4 Amplificación de una región del gen Factor de elongación-1α (EF-1α)**

Para la amplificación de una región del gen EF-1α se utilizaron los oligonucleótidos 938F y 156R (ACHGTRCCRATACCACCSATCTT) (Rehner, S.A. comunicación personal) para los aislamientos de *Beauveria* y para *Metarhizium* se usaron 938F y 2218R. Se obtuvieron 21 secuencias de aislamientos de *Beauveria*, 17 obtenidas de gallina ciega (Cuadro 4), y se adicionaron cuatro aislamientos para comparación

(Cuadro 5). Para el caso de *Metarhizium* se estudiaron nueve aislamientos dos de nuestro estudio MGC01 y MGC02, tres que fueron previamente obtenidos de larvas de Gallina ciega en el estado de Guanajuato (MGC06, MGC07 y LBIH) (Cuadro 4) y cuatro aislamientos adicionales obtenidos de diferentes insectos hospederos de otras localidades en México (Cuadro 5).

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 30  $\mu\text{L}$ , la cual contenía 3  $\mu\text{L}$  de buffer de PCR (Tris.Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 8.7), 0.2 mM de de los oligonucleótidos, 0.8 mM de dNTP's, 0.1  $\mu\text{L}$  de *Taq* Polimerasa (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany), 1.25 mM de  $\text{MgCl}_2$  (QIAGEN) y 10-20ng/ $\mu\text{l}$  de DNA. La amplificación se realizó en el termociclador My Cycler™ (Bio-RAD Laboratories Inc. ®. Hercules, CA, USA), la reacción fue realizada mediante el procedimiento denominado "Touch Down PCR" con las condiciones termales reportadas por Rehner y Buckley (2005). Para los aislamientos de *Beauveria* los productos de PCR obtenidos fueron re-amplificados con la metodología descrita anteriormente usando 3  $\mu\text{L}$  del producto de PCR con las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 min, seguidos por 35 ciclos desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación a 54.3°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min con una extensión final de 72°C por 5 min, los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE con marcadores de 100 pb Plus y 1Kb Plus (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y se fotografiaron.

### **3.3.2.5 Limpieza y obtención de las secuencias de los productos de PCR**

Todos los productos de reacción de PCR obtenidos de las regiones ITS,  $\beta$ -tubulina y EF1- $\alpha$ , se purificaron con el Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras purificadas se enviaron a la compañía Macrogen Inc. en Corea del Sur para su secuenciación directa.

### 3.3.2.6 Análisis de los datos

Todas las secuencias fueron editadas y ensambladas con el programa BioEdit (Hall, 1999). Los alineamientos múltiples se realizaron con Clustal W, el análisis de los datos se realizó por Máxima Parsimonia (MP), el Bootstrap del árbol consenso se realizó con 1000 replicas, el porcentaje de replicas de los árboles que se asocian con el taxa junto con la prueba de Bootstrap fue de 1000 replicas. El análisis de MP se obtuvo con el algoritmo de Close-Neighbor-Interchange con tres niveles de búsqueda en la que los árboles iniciales se obtuvieron con la adición de secuencias aleatorias de 10 repeticiones. Para este análisis se utilizó el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2001).

## 3.4 Resultados

### 3.4.1 Identificación morfológica

De acuerdo a la identificación morfológica inicial a género, todos los aislamientos pertenecieron a los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Aislamientos de larvas de gallina ciega en diversas regiones del estado de Guanajuato. Se señala el género determinado mediante la morfología del conidióforo

Aislamiento	Género	Hospedante	Origen geográfico	Condición
GC03	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	San Lorenzo, Jerécuaro	Terreno baldío
GC04	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	San Lorenzo, Jerécuaro	Terreno baldío
GC05	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	San Lorenzo, Jerécuaro	Terreno baldío
GC06	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	San Lorenzo, Jerécuaro	Terreno baldío
GC07	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	San Lorenzo, Jerécuaro	Terreno baldío
GC08	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	San Lorenzo, Jerécuaro	Terreno baldío
GC09	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Tierra Negra, Penjamo	Parcela de maíz
GC10	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Tierra Negra, Penjamo	Parcela de maíz
GC11	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Tierra Negra, Penjamo	Parcela de maíz
GC12	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Tierra Negra, Penjamo	Parcela de maíz
GC13	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Tierra Negra, Penjamo	Parcela de maíz
GC14	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Tierra Negra, Penjamo	Parcela de maíz
GC15	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	S. José de los Sabinos, Penjamo	Cultivo de Sorgo
GC16	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	S. José de los Sabinos, Penjamo	Cultivo de Sorgo
GC17	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	S. José de los Sabinos, Penjamo	Cultivo de Sorgo
GC18	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	S. José de los Sabinos, Penjamo	Cultivo de Sorgo
GC19	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	S. José de los Sabinos, Penjamo	Cultivo de Sorgo
GC20	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	S. José de los Sabinos, Penjamo	Cultivo de Sorgo
GC21	<i>Beauveria</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	S. José de los Sabinos, Penjamo	Cultivo de Sorgo
MGC01	<i>Metarhizium</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Puruagua, Jerécuaro	Parcela de maíz
MGC02	<i>Metarhizium</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Puruagua, Jerécuaro	Parecla de maíz
MGC06	<i>Metarhizium</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Puruagua, Jerécuaro	-----
MGC07	<i>Metarhizium</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Irapuato	-----
LBIH	<i>Metarhizium</i>	gallina ciega	-----	-----

Cuadro 5. Aislamientos obtenidos de la colección del laboratorio de Patología de Insectos Colegio de Postgraduados y usados como referencia.

Aislamiento	Género	Hospedante	Origen	Condición
Bb88	<i>Beauveria</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>	Costa de Oaxaca, Oax	Café
GHA	<i>Beauveria</i>	Producto comercial	-----	-----
Bb1	<i>Beauveria</i>	Hymenoptera	Jalisco	-----
Bb2	<i>Beauveria</i>	<i>Scyphophorus acupunctatus</i>	Jalisco	-----
Ma129	<i>Metarhizium</i>	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima	-----
Ma68	<i>Metarhizium</i>	<i>Aeneolamia postica</i>	Quintana Roó	Caña de azúcar
Ma65	<i>Metarhizium</i>	<i>Aeneolamia postica</i>	Veracruz	Caña de azúcar
Ma130	<i>Metarhizium</i>	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima	-----

### 3.4.1.1 Determinación específica con base en morfología del conidio

El análisis de componentes principales para conidios de *Beauveria* indicó que de las cuatro variables de las medidas de los conidios, únicamente dos factores fueron suficientes para agruparlos por su forma (Factor1= 65.5% y Factor 2= 33%), esto es que fueron separados por las medidas de largo y ancho. Esto se corroboró con una correlación positiva entre largo y ancho (0.994) lo que significa que son conidios más redondos.

Cuadro 6. Correlación entre variables y componentes para conidios de aislamientos de *Beauveria*

	F1	F2	F3	F4
<b>Largo</b>	<b>0.958</b>	-0.260	0.118	-0.010
<b>Ancho</b>	<b>0.983</b>	-0.176	0.048	0.012
<b>Elongación</b>	-0.858	-0.477	0.189	0.003
<b>Redondez</b>	0.013	<b>0.991</b>	0.130	0.001

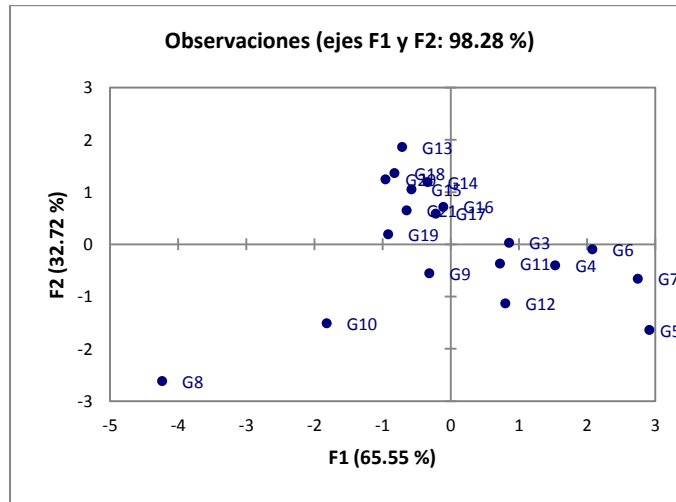


Figura 3. Gráfica de la matriz de los componentes: El primer factor agrupa conidios con características de *B. pseudobassiana*, el segundo factor agrupa conidios con características de *B. bassiana*.

En el primer factor (eje de las abscisas, lado derecho; largo=0.958 y ancho=0.983) por sus signos positivos agrupo a los conidios más redondos y grandes que fueron los del aislamiento G3, con un promedio de 1.41-4.82 x 1.21-4.190  $\mu\text{m}$  cuyas medidas se acercan a *B. bassiana*, mientras que los conidios ubicados al contrario (parte izquierda) de los aislamientos G4,G5,G6,G7, G11 y G12 con un promedio similar a los conidios del aislamiento G3 de 1.41-4.82 x 1.21-4.190  $\mu\text{m}$ ; en el caso del segundo factor (eje de las ordenadas redondez= 0.991 y poco elongados= -0.477) los conidios de los aislamientos G13, G14,G15,G16, G17, G18, G19, G20 y G21 son más redondos y más pequeños (parte superior) con un promedio de medidas de 1.55-3.939 x 1.24-3.12  $\mu\text{m}$  que están dentro de las medidas de los conidios de *B. pseudobassiana*; y al contrario los conidios de los aislamientos G8, G9, y G10 son menos redondos y un poco elongados (1.08-5.06 x 0.94-4.45  $\mu\text{m}$ ), pero también se ajustan al tamaño de los conidios de *B. bassiana* (Figura.3) (ANEXO).

En el caso de los conidios de aislamientos de *Metarhizium* el análisis de componentes principales nos indicó que del total de las cuatro variables dos factores fueron suficientes para agrupar (Factor 1=58.12% y Factor 2= 42 %), lo que significa que con

las medidas de largo y elongación fue suficiente para separarlos, esto se corroboró con una correlación positiva (0.968) lo que indicó que son conidios más largos.

Cuadro 7. Correlación entre las variables y los componentes para conidios de aislamientos de *Metarhizium*

	F1	F2	F3
<b>Largo</b>	<b>0.964</b>	0.265	0.003
<b>Ancho</b>	0.775	<b>-0.629</b>	0.059
<b>Elongación</b>	<b>0.868</b>	0.495	-0.042
<b>Redondez</b>	-0.202	<b>0.978</b>	0.058

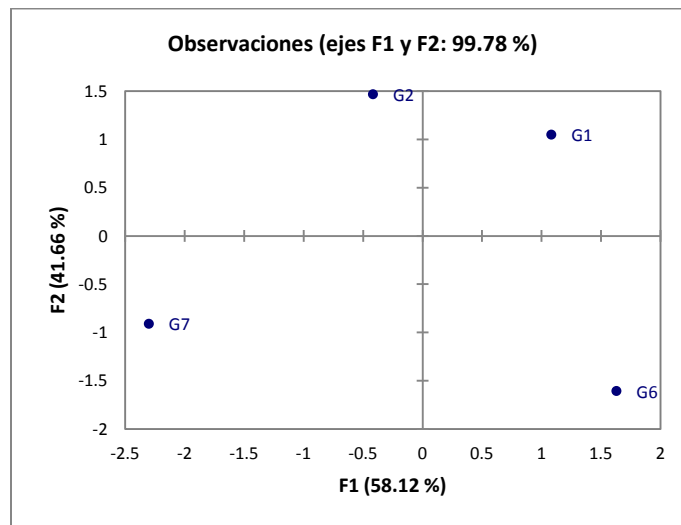


Figura 4. Gráfica de la matriz de los componentes: Factor 1: conidios con características de *M. anisopliae* var. *frigidum*; Factor 2: Conidios de tamaño pequeño con características de *M. anisopliae* var. *frigidum*

En el cuadro de correlación entre variables y componentes (Cuadro 7) el primer factor agrupó (eje de las abscisas; largo=0.964 y elongación=0.868) a conidios largos G1 (lado derecho) con un promedio de medidas de 5.9-9.9 x 2.2- 4.4  $\mu\text{m}$ , sus medidas están dentro de *M. anisopliae* var. *frigidum* y los agrupados al contrario G6 con medidas de 5.1-12-2 x 1.8-6.0  $\mu\text{m}$  son un poco más pequeños, las medidas se acercan también a *M. anisopliae* var. *frigidum*; el segundo factor (eje de las ordenadas, redondez= 0.978 y elongación= -0.629) agrupó los conidios (parte superior) menos elongados y un poco



redondos del aislamiento G2 con medidas de 5.0-9.0 x 2.1-4.2  $\mu\text{m}$ , están dentro de *M. anisopliae* var. *frigidum*, mientras que los conidios situados al contrario (parte inferior) de G7 de 3.3-9.5 x 1.6- 5.8  $\mu\text{m}$  son más elongados y más pequeños, las medidas se acercan también a *M. anisopliae* var. *frigidum* , sin embargo el tamaño de los conidios puede deberse a las condiciones de los nutrientes del medio de cultivo (Figura. 4) (ANEXO).

### **3.4.3 Identificación molecular**

#### **3.4.3.1 Amplificación de la región ITS**

En el caso de los aislamientos de *Beauveria* se obtuvo un total de 17 secuencias. Las secuencias tuvieron una longitud de entre 539 y 588 pares de bases (pb). El análisis filogenético de estas secuencias agrupa a todos los aislamientos obtenidos de gallina ciega en el Clado C (*B. pseudobassiana*), mientras que los aislamientos GHA, Bb1 y Bb2 se agruparon en el Clado A (*B. bassiana*), con un soporte de rama de 61% (Figura 5).

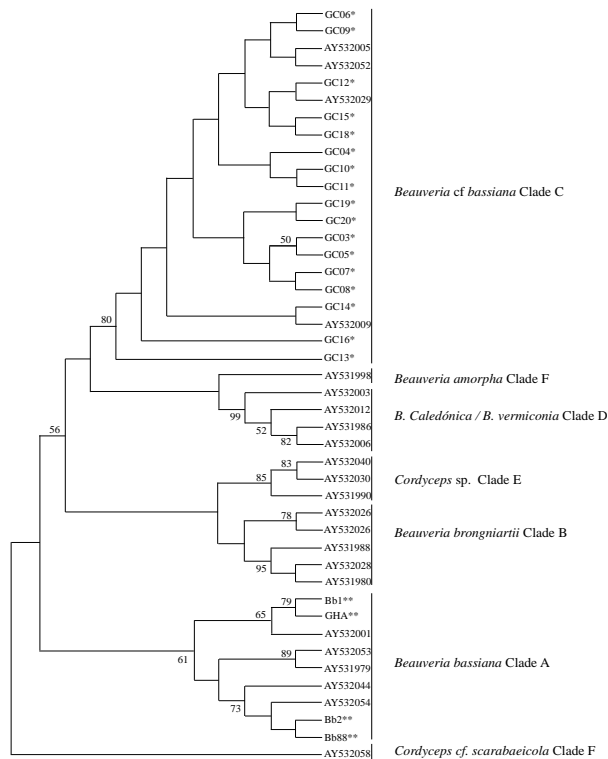


Figura 5 Dendrograma para *Beauveria* construido con las secuencias de la región ITS (ITS4-5.8S-ITS5 de ADNr) con base en el método de Máxima Parsimonia. Los números del dendrograma representan los valores “bootstrap”. Las secuencias empleadas como referencia para la colocación filogenética de los aislamientos, fueron obtenidas del GenBank, se muestran los números de acceso.

En el caso de los aislamientos de *Metarhizium* se obtuvieron un total de nueve secuencias de la región ITS, cuyas longitudes variaron de 554 a 760 pb. En el análisis se incluyeron cuatro secuencias del grupo de interés y 15 secuencias de comparación. El análisis de MP colocó a los aislamientos MGC01, MGC02 y MGC06 cercanos a *M. anisopliae*, mientras que el aislamiento MGC07 se separó con un soporte de rama de 90% con respecto a las especies *M. majus*, *M. pingshaense*, *M. robertsii*, *M. guizhouense*, *M. anisopliae* y un soporte de rama de 100% con *M. brunneum*; el aislamiento LBIH fue colocado junto a *M. robertsii* pero con un valor de bootstrap inferior al 50% de probabilidad (Figura 6).

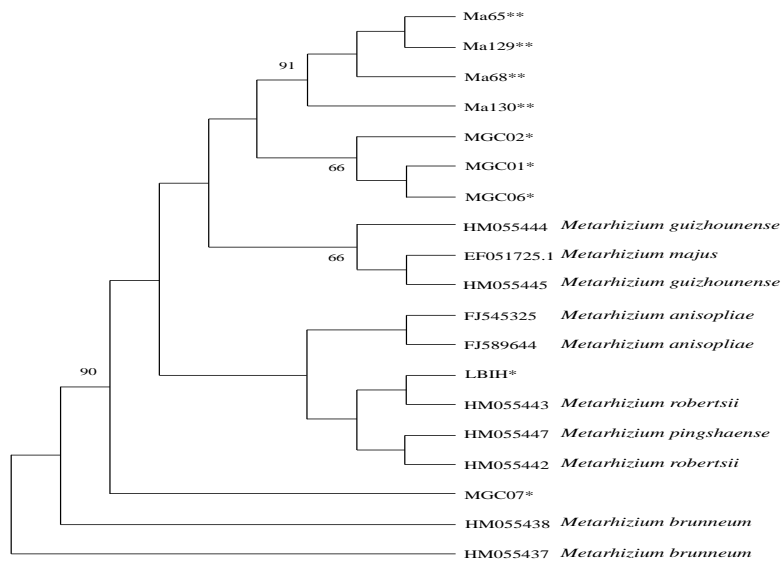


Figura 6. Dendrograma de *Metarhizium* construido con las secuencias de la región ITS (ITS4-5.8S-ITS5) de ADNr con base en el método de Máxima Parsimonia. Los números de cada rama del dendrograma representan los valores “bootstrap”.

### 3.4.3.2. Amplificación de una región del gen EF-1 $\alpha$

Para los aislamientos de *Beauveria* se obtuvieron un total de 17 secuencias, con longitudes de 379 a 478 pb. El análisis filogenético colocó a todos los aislamientos dentro del grupo de la especie *B. pseudobassiana* (Rehner *et al.*, 2011) con un soporte de rama de 53%, mientras que los aislamientos GHA, Bb1 y Bb2 se ubicaron dentro del grupo de *B. bassiana* con un soporte de rama de 48% (Figura 7).

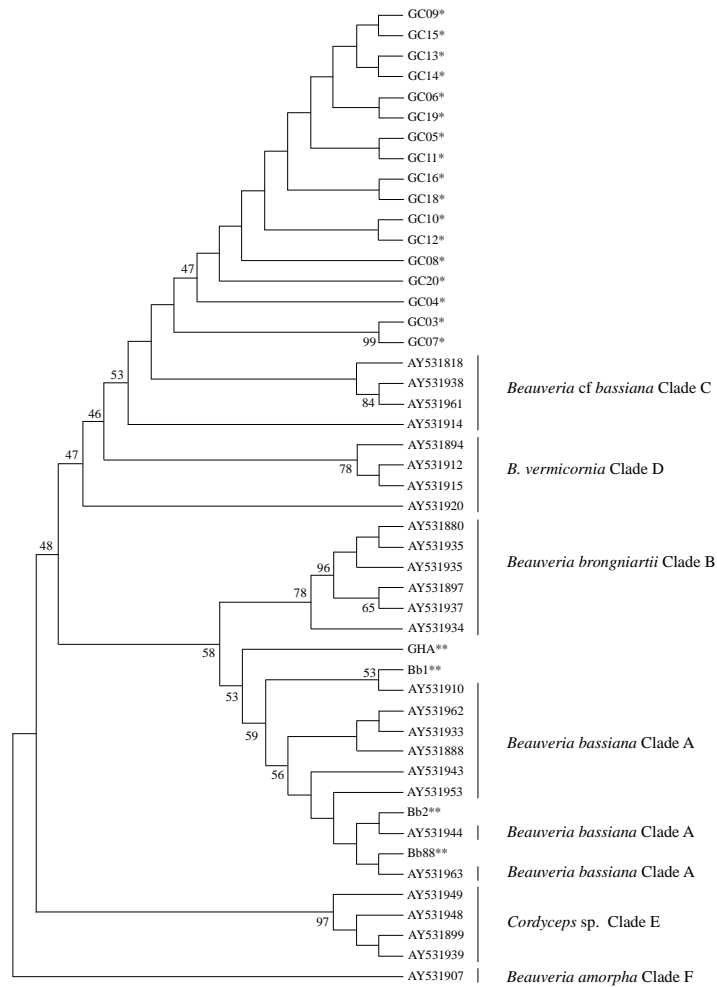


Figura 7. Dendrograma para *Beauveria* construido con las secuencias de la región EF-1 $\alpha$  (Exón3-Intrón3- Exón 4) con base en el Método de Máxima Parsimonia. Los números de cada rama del dendrograma representan los valores “bootstrap”.

Para el caso de *Metarhizium* se obtuvo con un total de nueve secuencias, cuyas longitudes fueron 379 a 478 pb. El análisis filogenético ubicó a los aislamientos MGC01, MGC02 y MGC06 cercanos a *M. pingshaense* con un soporte de rama de 77%, mientras que el aislamiento MGC07 mostró mayor similitud con la especie *M. anisopliae*, y el aislamiento LBIH mostro una mayor similitud con (81 %) la especie *M. robertsii* (Figura 8).

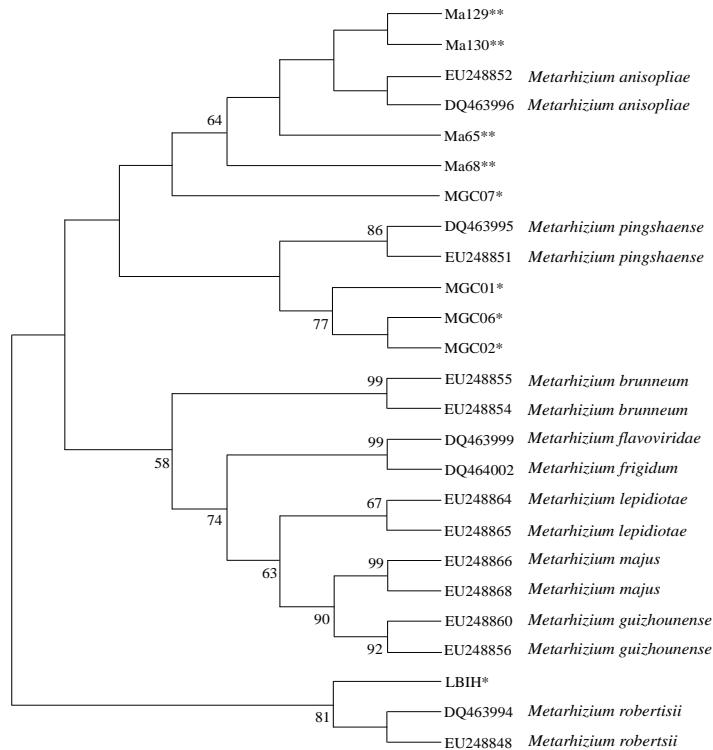


Figura 8. Dendrograma para *Metarhizium* construido con las secuencias de la región EF-1 $\alpha$  (Exón 3-Intrón 3-Exón 4) con base en el método de Máximo de Parsimonia. Los números de cada rama del dendrograma representan los valores “bootstrap”.

### 3.4.3.3. Amplificación de la región Bt2 del gen $\beta$ -tubulina

La amplificación del gen  $\beta$ -tubulina con los oligonucleótidos Bt2a y Bt2b produjeron fragmentos de 366 a 393 pb para *Metarhizium*, con un total de nueve secuencias, mientras que en *Beauveria* se produjeron secuencias de 333 a 540 pb de un total de 17 secuencias. El análisis realizado con este gen mostró que los aislamientos tienen

mayor similitud con la especie *M. pingshaense* y el aislamiento LBIH está cercano *M. robertsii* con un soporte de rama de 54%, (Figura 9).

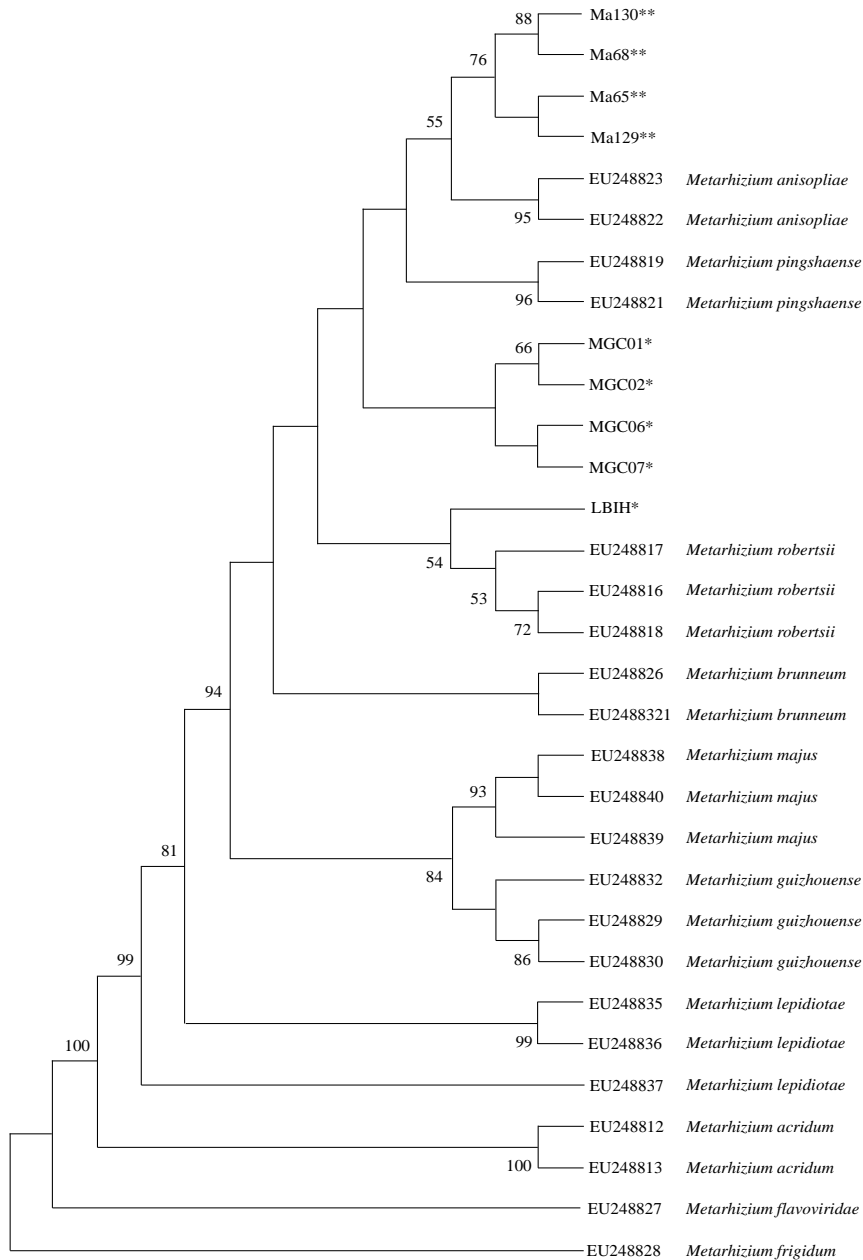


Figura 9. Dendrograma de *Metarhizium* construido con las secuencias de la región de  $\beta$ -*tubulina* con base en el método de Máxima Parsimonia. Los números de cada rama del dendrograma representan los valores “bootstrap”.

Mientras que para los aislamientos de *Beauveria* en la filogenia con las especies seleccionadas los aislamientos de interés en este estudio se encuentran separados de *B. bassiana* con un soporte de rama de 94%. Estos resultados confirman la separación de los aislamientos bajo estudio de la especie *B. bassiana* lo que soporta aun mas lo encontrado en el análisis de los genes anteriores, que agrupa a los aislamientos en el grupo de la especie *B. pseudobassiana* (Figura 10).

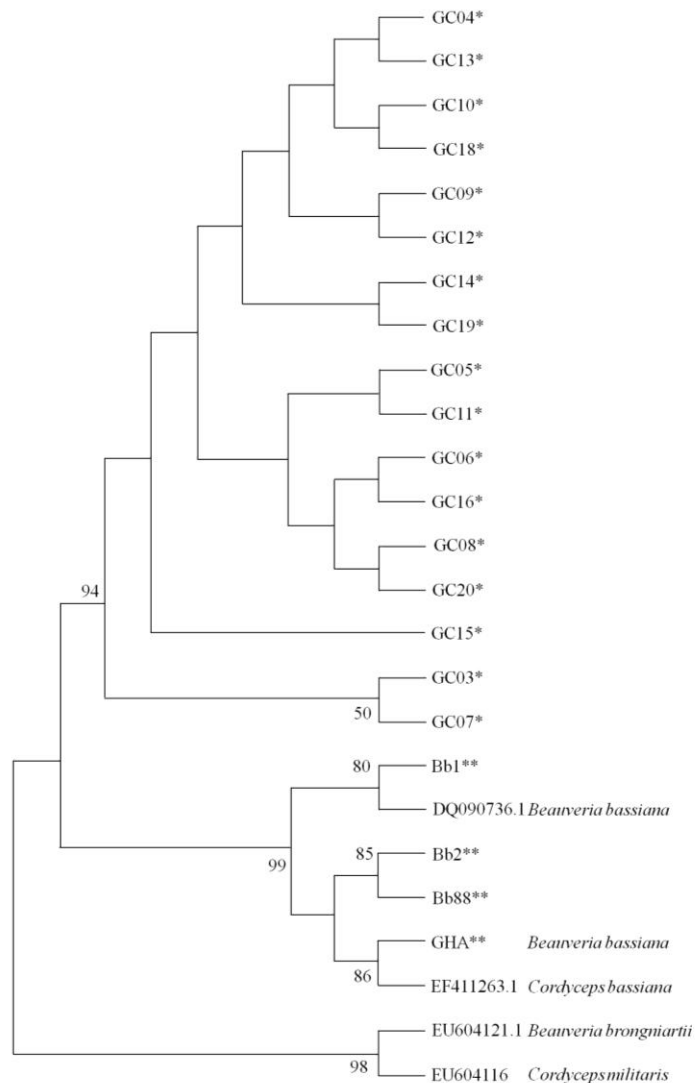


Figura 10. Dendrograma para *Beauveria* construidos con las secuencias de la región  $\beta$ -tubulina con base en el método de Máxima Parsimonia. Los números de cada rama del dendrograma representan los valores “bootstrap”.

### 3.5 Discusión

Los resultados muestran que la identificación molecular es una herramienta muy poderosa para la determinación más precisa de los aislamientos bajo estudio, a pesar de que morfológicamente todos los aislamientos podrían considerarse que pertenecen a *B. bassiana* y *B. pseudobassiana*, genéticamente todos los aislamientos mostraron la mayor similitud con esta última especie. El análisis morfológico posee un mayor riesgo en la determinación específica de los aislamientos ya que el factor principal es el tamaño del conidio. No obstante, el tamaño de estos podría estar influenciado por el medio y condiciones de cultivo modificando los resultados finales de las mediciones. El análisis genético posee una ventaja a este respecto, ya que los genes estudiados siempre van a estar presentes en el genoma del hongo independientemente de sus condiciones de cultivo; aún así, algo que también debe considerarse para este análisis es el gen que se emplea, ya que como se observó en los resultados, podría variar entre genes, para el caso de *Beauveria* se considera que los resultados más confiables se obtuvieron con el EF-1 $\alpha$ , esto coincidió con los mencionado por otros autores (Rehner y Buckley, 2005), Con base en esto se concluye que los aislamientos estudiados aquí pertenecen a la especie *B. pseudobassiana*.

El análisis morfológico de los conidios de *Metarhizium* indicaba la existencia de una sola especie, *M. anisopliae*; sin embargo, el análisis filogenético mostró que los aislamientos pertenecen a tres especies, dicho análisis se tomó como base la información del gen EF-1 $\alpha$ , coincidiendo con la separación entre especies que ha sido reportado por otros autores (Bischoff *et al.*, 2009).

Por las dimensiones y formas de los conidios se han reconocido diversas especies, *Metarhizium*. Con la base morfológica se ha determinado un grupo de *M. a. acridum* exclusivamente asociado a acrídidos y detectado en el este de África, Tanzania, Islas Galápagos (Lomer *et al*, 1997) y México (Hernández *et al*, 2000). Los conidios de esta especie son verde oscuro y su tamaño se traslapa entre *M. f. var. flavoviride* y *M. f. var. Minus*. En nuestro caso, los conidios de cada aislamientos fueron ligeramente



más grados que los conidios de *M. anisopliae*, lo que sugirió su pertenencia a otra especie, esto se confirmó posteriormente con los estudios moleculares.

Bischoff *et al.* (2009) menciona que las medidas de los conidios de *M. pingshaense* están dentro del rango de los conidios de *M. anisopliae*, a pesar de que esta característica puede ayudar a diferenciar especies, las herramientas moleculares son la forma más confiable de diferenciar las especies dentro del complejo de *Metarhizium anisopliae*. Según estos autores con la región 5' del gen EF-1 $\alpha$ , reconocieron nueve especies de este género que son *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum stat. nov.*, *M. lepidiotae stat. nov.*, *M. majus stat. nov.*, *M. globosum*, *M. robertsii* y *M. brunneum*. En el caso de los aislamientos de este estudio la amplificación de la región EF-1 $\alpha$  contribuyó a determinar que los aislamientos MGC01, MGC02 y MGC06 se agruparon en *M. pingshaense*, aunque el porcentaje de soporte de la rama fue de 77%, las regiones variables menores fueron suficientes para diferenciar la especie, siendo este el primer reporte de *M. pingshaense* para México.

### 3.6 Literatura citada

Bischoff J., F., S. A. Rehner and R. A. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. The Mycological Society of America, Lawrence. 101: 512-530.

Butler D., K. and R.L. Metzenberg. 1989. Premeiotic change of nucleolus organizer site in *Neurospora*. *Genetics*. 122: 783-791.

Einax, E. and K. Voigt. 2003. Oligonucleotide primers for universal amplification of  $\beta$ -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Org. Divers. Evol.* 3: 185-194.

Enkerli J. and F. Widmer. 2010. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools their applications in population and fate studies. *BioControl*. 55: 17-37.

Fargues J., B., M.C. Manguin and Y. Couteaudier. 2002. Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on the rDNA-ITS regions. *Mycol. Res.* 106:1066-1074

Glass N., L. and G.C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323-1330.

Hall T., A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/N.T. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 45:95-98.

Hernández V., P.V.M. Berlanga y A. M. Barrientos. 2000. Vegetable and mineral oil formulation of *Metarhizium flavoviride* to control the central American locust (*Schistocerca piceifrons*) (Orthoptera:Acrididae). *Orthoptera Research*. 9: 223-227.

Humber R., A. 1997. Fungi-Identification. *In* Manual of Techniques in Insect Pathology, ed. L. Lacey. London: Academic Press. 153-185.

Kreuzer H. and A. Massey. 2008. Molecular Biology and Biotechnology *A Guide for Students*. Third edition. ASM PRESS Washington, D.C.

Little M. and T. Seehaus. 1988. Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp Biochem Physiol B.* 90 : 655–670.

Lomer C. J., C Prior and C. Kooyman. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control grasshoppers and locusts. Microbial Control of Grasshoppers and Locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada, Ottawa, ON. 171:265-286.

Macias O.,L., Y. Delgado C., E. Peña M., R. León B y R. Elías B. 2006. Técnicas para el diagnóstico y determinación de la variabilidad genética de fitopatógenos. Universidad de Matanzas Tesis “Camilo Cienfuegos”.pp.29.

Meyling N., V. and E. Hajek. 2010. Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. BioControl 55: 39-54.

O'Donnell K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. PNAS 95: 2044-2049.

Perdomo Z., H. M. 2011. Caracterización fenotípica y molecular de hongos filamentosos oportunistas: *Scedosporium*, *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* y *Paecilomyces*. *Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques*. Univ. Rovira I Virgili. p. 211.

Rehner S., A., A.M. Minnis, Gi-Ho Sung, J.J. Luangsa-ard, L. Devetto and R.A. Humber. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103: 1055-1073.

Rehner S., A. and E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97: 84-98.

Ríos T., S. and L. O. Ríos. 2011. Principal molecular markers used to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Rev. MVZ. Cordoba*. 16:2470-2483.

Ruiz D., B. 2005. Introducción a la biología molecular de *Scedosporium prolificans* (Fungi Imperfecti) Univerisdad Complutense de Madrid. España. p 16.

Tamura K, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.

Tanabe Y., M. Saikawa, M.M. Watanabe and J. Sugiyama. 2004. Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 $\alpha$  and RPB1sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 438-449.

Valadez E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y Protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa. México, S.A. de C.V. 147 pp.

Vossbrinck C., R.and B.A. Debrunner-Vossbrinck. 2005. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultraestructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitologica* 52:131-142.

Watson J.,D., M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller. 1998. Recombinant DNA. Scientific American Books. W. H. Freeman Company. New York.pp 626.

Wilcox D., B. Dove, D. McDavid and D. Grenn. 2002. UTHSCSA Image Tool for Windows v. 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio, U.S.A.

White T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols A. Guide to Methods and Applications*. 38 (5):315-322

## **CAPÍTULO IV. VARIACIÓN GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria***

### **4.1 Introducción**

La variación genética de una población o especie se encuentra en su material genético e incluye los genomas nucleares, mitocondrial, ribosomal y otros orgánulos. Una variación genética puede darse por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo. Los principales procesos que afectan la variación genética son la selección natural y la deriva genética. Becerra *et al.*, (2007) mencionaron que para complementar estudios de clasificación, que incluyan morfología y eficacia como controlador biológico es necesario complementar los estudios con una caracterización genético-molecular, que permita determinar el nivel de diversidad

Los estudios realizados a la clasificación de *Beauveria* y *Metarhizium*, se completan con estudios a nivel genético mediante la caracterización molecular que permite la determinación de la variación genética en la especie, utilizando técnicas como la de RFLP (Fragmentos de Restricción Polimórficos), RAPD (DNA polimórfico amplificado al Azar), las SSR (Secuencias Simples Repetidas). Los objetivos de estudio fueron encontrar variación genética entre aislamientos de *B. pseudobassina* ya que esta especie fue la que se encontró en mayor abundancia infectando larvas de gallina ciega. No se intento hacer este estudio con los aislamientos de *Metarhizium* ya que se disponía de pocos aislamientos por especie.

### **4.2 ERIC (Secuencias Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias)**

Las Secuencias Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias(ERIC) fueron descritas por primera vez en *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, las secuencias ERIC son palindromas imperfectos de 127 pb, producidas por deleciones y se encuentran en las regiones intergénica, el número de

copias varía entre especies (Wilson y Sharp, 2006). Mediante PCR se convierte en una técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gram negativas como *A. baumannii*, los patrones de ADN que se obtienen suelen ser menos complejos que los que se generan por otros marcadores (Gräser, *et al.*, 1993). En el caso de aislamientos de *Pochonia chlamydosporia*, estos marcadores fueron utilizados para examinar la variación genética entre poblaciones de este hongo, donde los resultados fueron más reproducibles que los oligonucleótidos estándares para RAPD-PCR (Flores, *et al.*, 2008).

### **4.3 Microsatélites**

Los microsatélites son categorías de secuencias de 1 a 5 nucleótidos que se encuentran en eucariontes dispersas a través de su genoma, cada *locus* tiene distinto número de repeticiones variables que se asocian a alelos específicos de alta variabilidad y a través de estos se han obtenido patrones complejos de ADN en animales, plantas y microorganismos (Condit y Hubbell, 1991). Mediante los microsatélites se puede encontrar y medir la diversidad entre genotipos amplificado mediante PCR la región del ADN que contengan las secuencias repetidas. Los microsatélites son atractivos por sus diversas ventajas, tales como codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad, así como su alto nivel de polimorfismo que permite una discriminación entre individuos altamente emparentados. Las condiciones de amplificación y de reacción son específicas y la variación en el largo de los productos amplificados por PCR es en función del número de unidades repetidas (Becerra y Paredes, 2000).

## 4.4 Material y Métodos

### 4.4.1 Análisis ERIC

Para este estudio se utilizaron los oligonucleótidos R1CIRE (CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA) y ERIC2 (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) (Versalovic, 1991) mediante PCR convencional. La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20  $\mu$ L por tubo, el cual contenía 0.2 mM de cada iniciador, 0.15 mM de dNTP's, 0.01 U de *Taq* ADN Polimerasa (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany), contenidos en 1X de la mezcla de reacción para PCR con 2  $\mu$ L de buffer (Tris.Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 8.7) y 20 ng/ $\mu$ L de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador My Cycler™ (Bio-RAD) el programa incluyo un ciclo inicial de 2 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 46 °C, 1 min a 72 °C y un ciclo de 5 min a 72 °C (Versalovic, 1991). Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (14x15.5) en la solución tampón 1x TBE GelPilot® el tamaño del marcador fue de 100 bp Plus (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany) a 80 Volts por 4 h. El gel se tiño con bromuro de etidio ( $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) para visualizar los fragmentos bajo la luz UV se realizo en un fotodocumentador.

### 4.4.2 Microsatélites

Para este estudio se utilizaron 19 microsatélites Ba06, Ba08, Ba12, Ba13, Ba14, Ba15, Ba 16, Ba17, Ba18, Ba20, Ba21, Ba22, Ba23, Ba24, Ba25, Ba26, Ba27, Ba28, Ba29 (Meyling, *et al.*, 2009); la concentración de ADN fue de 5-50ng/ $\mu$ l. La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20  $\mu$ L por tubo, el cual contenía 0.5 mM de cada iniciador, 0.2 mM de dNTP's, 0.1 U de *Taq* DNA Polimerasa, contenidos en 1X de la mezcla maestra de amplificación (*NEW ENGLAND BioLabs*) y 2  $\mu$ L de

buffer 10x (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, pH 8.8) (New England BioLabs Inc. Ipswich, MA, USA). La amplificación se realizó en un termociclador My Cycler™ (Bio-RAD) el programa incluyó un ciclo inicial de 2 min a 95 °C, seguido por 10 ciclos de 30 s de 1°C ↓ 66°C, 1 min a 72 °C, 36 ciclos 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C, 1 min a 72 °C, un ciclo de 30s a 72 °C. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa MetaPhor (Cambrex, Rockland, ME, USA) al 4% (14x15.5) en buffer TAE los marcadores usados fueron de 100 bp Plus y 50 bp (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.1 µg ml<sup>-1</sup>) y se visualizaron los fragmentos bajo la luz UV en un fotodocumentador.

#### **4.4.3 Análisis de datos**

Con los fragmentos de DNA amplificados de ERIC-PCR y Microsatélites se elaboraron matrices binarias para cada grupo, los datos fueron procesados en Microsoft Office Excel 2007. Para el análisis de variación se utilizó el programa FreeTree Versión 0.9.1.50 Copyright © (Pavlièek, *et al.*, 1999), donde se analizaron las matrices binarias y los árboles se realizaron en el programa TreeViewX Versión 0.5.0 (Roderic D.). Los datos fueron comparados usando el coeficiente de Jaccard con un análisis de similaridad de UPGMA y un árbol NJ (Neighbour Joining), con 100 réplicas

### **4.5 Resultados**

#### **4.5.1 ERIC-PCR**

Los 17 aislamientos de *B. pseudobassiana* produjeron entre una a tres bandas en un rango comprendido de 300 a 1500 pb y fueron agrupados en dos *clusters*. El primer



grupo se conformó por la mayoría de los aislamientos excepto los aislamientos GC13 y GC18, los cuales estuvieron en otro cluster (Figura 11).

#### **4.5.2 Microsatélites**

La caracterización mediante microsatélites no reveló una diversidad genética significativa (Figura 12). De los 17 aislamientos se formaron dos grupos en uno se encuentran 16 de los aislamientos colectados en los tres sitios diferentes, mientras que en el segundo grupo se encuentra el aislamiento GC16 el cual tiene 100% de disimilitud con respecto a los otros aislamientos. En total fueron 65 alelos detectados con 9 microsatélites en 17 aislamientos. El número de alelos y el rango de tamaño (pb) detectado por cada oligonucleótido fue: Ba013 (11, 100-150), Ba015 (1, 200), Ba020 (1, 200), Ba021 (2, 200), Ba022 (9, 100-150), Ba025 (15, 150-200), Ba026 (12, 150-200), Ba027 (2, 150) y Ba029 (12, 150).

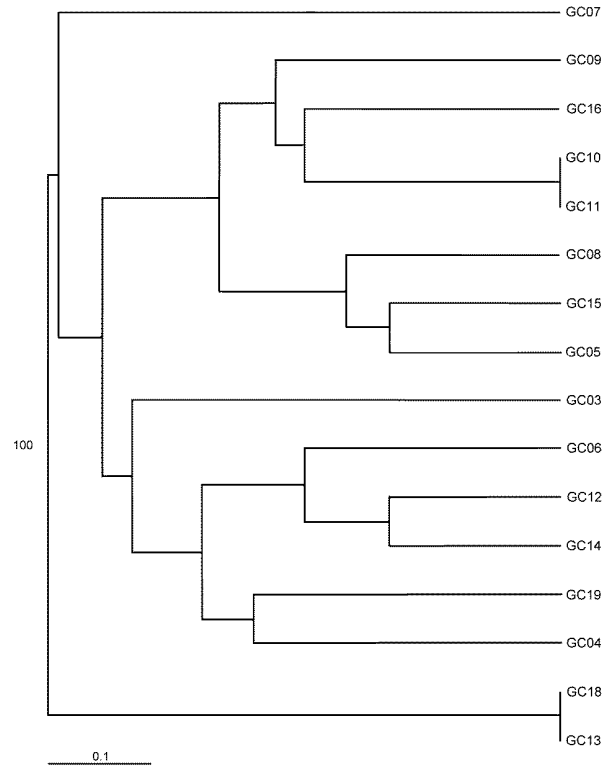


Figura 11. Dendrograma de similitud genética realizado con NJ de una matriz creada a partir del coeficiente de Jaccard entre los 17 aislamientos de *B. pseudobassiana*, basada en la presencia o ausencia de productos de PCR obtenidos con el análisis ERIC. Se colocaron sólo valores de inicio mayores al 70% por encima de la muestra.

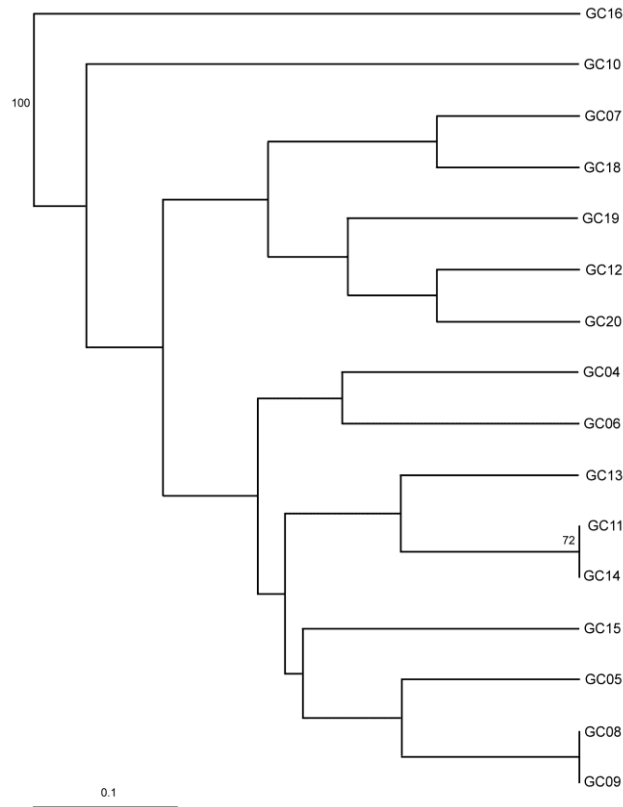


Figura 12. Dendrograma de similitud genética determinada por el análisis de NJ a partir de una matriz mediante el coeficiente de Jaccard entre los 17 aislamientos de *B. pseudobassiana*. El análisis se basó en 65 alelos detectados en los nueve loci de microsatélites (sólo se representaron los valores de inicio mayores a 70%).

#### 4.6. Discusión

El análisis ERIC ha mostrado ser altamente reproducible y de variantes sensibles a la amplificación en otras especies de hongos (Flores *et al.*, 2008; Bibanco *et al.*, 2010). Los 17 aislamientos de interés, se colectaron en tres sitios diferentes (Cuadro 4) lo que indica que su lugar de recolecta no influyó en la variación genética ya que los aislamientos están dentro de un solo grupo. Es probable que el hecho de que todos los aislamientos provengan de un mismo tipo de hospedante haya contribuido a su escasa variación genética. En algunos casos como en *Botrytis*, la especie *B. cinerea* se caracteriza por su gran variación genética, pero los mecanismos involucrados no se

conocen, y su variación la adjudican a los medios de cultivo donde presentan diversidad fenotípica y morfológica como producción de enzimas, patogenicidad o resistencia a fungicidas (Carbú, 2006). Grindle (1979), menciona que la heterocariosis en hongos es la responsable de la variación genética, por lo que en nuestro caso, el haber trabajado con cultivos monospóricos pudo haber contribuido a la reducción en diversidad genética de cada aislamiento. Sin embargo, se considera que el hecho de haber sido obtenidos de un mismo tipo de hospedante es el factor para que los aislamientos hayan tenido una muy baja diversidad genética.

#### 4.7 Literatura citada

Becerra V., V., C. M.Paredes, M.C. Rojo y A. France. 2007. RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. Agricultura Técnica (Chile) 67):115-125.

Becerra V., V. and M. Paredes. 2000. Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. Agric. Téc. 60: 270-280.

Bibanco K.,R.P., M.P. Nunes, E. Cia, M. A. Pizzinatto, I. Schuster and Y. R. Mehta. 2010. Identification of genetic variability among isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* of cotton. Tropical Plant Pathology. 35: 241-244.

Carbú, M. E. 2006. Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. Laboratorio de Microbiología. pp 223.

Condit R. and S.P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. Genome 34:66-71

Flores C., R., S.D. Atkins, L.R. Manzanilla H., V.I.C. Prado y A. Martínez. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne). Thorne y Allen. Rev. Mexicana de Fitopatología. 26: 93-104.

Gräser Y., I. Clare, E. Halle, R. Gantenberg, P. Buchholz and H.D. Jacobi. 1993. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by polymerase chain reaction fingerprinting. J Clin Microbiol 31:2417-2420.

Grindle M.1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. Journal of General Microbiology. 111:109-120.

Pavlíček A., T. Pavlíček and J. Flegr. 1998-1999. FreeTree-prerelease version 0.9.1.50.

Versalovic J., T. Koeuth and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*.19): 6823-6831.

Wilson L., A. and P. M. Sharp. 2006. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. Mol. Biol. Evol. 23:1156-1168.

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL

En general, se encontraron más aislamientos de *Beauveria* que *Metarhizium*. El hecho de que *Beuaveria* puede ser más persistente en el ambiente (Meyling y Eilenberg, 2006) pudo haber contribuido a que se obtuvieran más aislamientos de *Beauveria* que *Metarhizium*. Algunos de los aislamientos de *Beauveria* se recolectaron de larvas con una esporulación abundante, lo cual sugiere que esta especie sobrevive mediante infecciones repetitivas (Fargues y Roberts, 1985). Esto fue diferente con los aislamientos de *Metarhizium*, ya que las larvas infectadas nunca presentaron una esporulación abundante. El cómo estos aislamientos sobreviven cuando no está la larva en el campo es aún desconocido, pero es probable que la infección del hospedante es solo una parte del ciclo de vida de estos hongos (Meyling y Eilenberg, 2007). También es probable que las larvas de gallina ciega sean su hospedante secundario, y que el hospedante primario sea un insecto de otra especie. Esto no se evaluó en esta investigación, pero remarca la necesidad de realizar mayor investigación respecto a este tema.

Las técnicas moleculares son herramientas indispensables en el entendimiento sobre la distribución y diversidad de hongos entomopatógenos en el ambiente (Rehner y Buckley 2005). Los resultados que aquí se presentan muestran una limitada diversidad de especies dentro del género *Beauveria* ya que todos los aislamientos correspondieron a *B. pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber, sp. nov. (Rehner, *et al.*, 2011), Además es importante destacar que este es el primer reporte de esta especie para México. Es posible que la misma especie se pueda recuperar en diferentes tiempos pero en la misma zona geográfica. Sin embargo, también es probable que otras especies de *Beauveria* se puedan obtener por otros métodos de muestreo en diferentes lugares e insectos hospedantes (Meyling *et al.*, 2009). Esta hipótesis se refuerza con el hecho de que otros cuatro aislamientos de *Beauveria* incluidos en la comparación (Bb1, Bb2, Bb88 and GHA) fueron agrupados junto a *B. bassiana*, y estos

aislamientos se obtuvieron en otros estados de la república Mexicana y de otros insectos hospedantes. Mientras que en *Metarhizium* se encontró una mayor diversidad de especies del género infectando a larvas de gallina ciega.

El análisis filogenético mostró la existencia de tres especies; *M. anisopliae* (MGC07), *M. robertsii* (LBIH) y *M. pingshaense* (MGC06, GC01 and GC02), además la información generada a partir de las secuencias parciales del gen EF-1 $\alpha$  fueron más informativas para la separación de especies en el género *Metarhizium* (Bishoff, *et al.*, 2009). De acuerdo a estos resultados, en las localidades muestreadas del estado de Guanajuato, lograron encontrar tres especies del género *Metarhizium* infectando larvas de gallina ciega. Esto representa el primer reporte de *M. pingshaense* y *M. robertsii* para México. El porqué se encontró más especies de *Metarhizium* que de *Beauveria* infectando larvas de gallina ciega requiere de más investigación.

Durante el desarrollo de este trabajo no se registraron relaciones entre presencia y ausencia de especies particulares asociadas con propiedades específicas del suelo y clima. Sin embargo, los resultados de los muestreos en Guanajuato confirman lo reportado por otros autores que indican que *Metarhizium anisopliae sensulato* es un complejo de especies crípticas con distribución cosmopolita (Bidochka y Small, 2005).

Los aislamientos MGC01 y MGC02, identificados como *M. pingshaense*, se recolectaron en larvas de gallina ciega en Jerécuaro en el año 2007, el aislamiento MGC06 también identificado como *M. pingshaense*, se recolectó en larvas de gallina ciega en la misma región pero en un año anterior. El aislamiento MGC07 identificado como *M. anisopliae* se recolectó también de una larva de gallina ciega infectada pero en Irapuato, Guanajuato. No hay datos de colecta para el aislamiento LBIH (*M. robertsii*), sólo que fue obtenido de una larva de gallina ciega no identificada. Todos estos datos sugieren una estrecha relación entre especies de *Metarhizium* y origen geográfico.

Se ha sugerido que en regiones templadas, la presencia de diferentes grupos genéticos de *Metarhizium* está fuertemente relacionada con el hábitat más que con el insecto hospedante (Bidochka y Small 2005).

De todos los aislamientos recolectados, algunos no esporularon en el medio de cultivo, lo que dificultó la preparación de la suspensión de conidios con la concentración

requerida para su evaluación en los ensayos de infectividad, por esta razón se utilizó un número reducido de aislamientos de *Beauveria* en esos experimentos. En el caso de *Metarhizium*, sólo el aislamiento LBIH no esporuló y se excluyó del experimento de infectividad. Para el caso de *Beauveria*, únicamente 11 aislamientos se evaluaron en larvas de *P. polyphylla* y *A. cincta*. A pesar de que las mortalidades, en larvas de *P. polyphylla* nunca excedieron el 50%, este resultado confirma su patogenicidad hacia estos insectos. En ambas especies de gallina ciega, las mortalidades obtenidas por los aislamientos de *Beauveria* fueron bajas, pero los aislamientos de *Metarhizium* fueron muy virulentos contra las larvas de *A. cincta*. Es posible que la población abundante y homogénea de *B. pseudobassiana* que está en el campo, haya co-evolucionado con las poblaciones de gallina ciega resultando en una baja virulencia. Por otro lado, la presencia de diferentes especies de *Metarhizium*, que posiblemente ocurran en una sucesión de especies a través del tiempo, probablemente han tenido diferente co-evolución con las poblaciones de gallina ciega, dando como resultado diferentes grados de mortalidad en larvas de *A. cincta*. Esto sugiere una relación más complicada entre las especies de hongos entomopatógenos y sus hospedantes en el suelo, lo cual exige investigación para entender el papel de estas especies de hongos entomopatógenos en la regulación de las poblaciones de gallina ciega en Guanajuato.

Los estudios de variación genética se realizaron únicamente con *B. pseudobassiana* por el gran número de aislamientos obtenidos en comparación con los aislamientos de *Metarhizium*. Los microsatélites mostraron que los 17 aislamientos de *B. pseudobassiana* están en dos haplotipos, lo cual pudo ser consecuencia de haber sido obtenidos de un mismo tipo de hospedante y de un número limitado de localidades en Guanajuato. Es probable que la inclusión de aislamientos de otras regiones del país pudiese proporcionar mayor diversidad genética intra-específica, de hecho algunos autores indican que aislamientos en ambientes no agrícolas, u otros insectos hospedantes, podría ser suficiente para tener mayor diversidad genética (Meyling *et al.*, 2009). Usando los mismos microsatélites que en esta investigación, Castrillo *et al.*,(2010) encontraron una mayor diversidad genética en aislamientos obtenidos de adultos infectados de *Agilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae); sin embargo, todos los aislamientos usados por estos autores se identificaron



morfológicamente, y como ya se demostró, las especies crípticas no pueden ser detectadas morfológicamente, por lo que es posible que la diversidad genética reportada por estos autores podría estar influenciada por la presencia de especies crípticas. El análisis ERIC confirmó la escasa diversidad genética entre los aislamientos de *B. pseudobassiana*. Esta técnica probó ser muy poderosa para separar aislamientos de otros hongos entomopatógenos, como lo encontrado en aislamientos de *Pandora neoaphidis* (Tymon y Pell, 2005). Aquí es importante indicar que todos los aislamientos usados por Tymon y Pell (2005) fueron de diferentes especies de áfidos y diferentes países. Esto podría soportar que la escasa diversidad genética de los aislamientos de Guanajuato pudiera deberse al origen restringido de las recolectas.

En resumen, se encontraron las especies *B. pseudobassiana*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense* y *M. robertsii* infectando larvas de gallina ciega en Guanajuato, México. Todas las especies, excepto *M. anisopliae*, representan el primer reporte para México. *Beauveria pseudobassiana* es la especie más abundante en comparación con las especies de *Metarhizium*. Los resultados aquí presentados proveen información fundamental acerca de la diversidad y estructura genética de poblaciones de hongos entomopatógenos asociados a larvas de gallina ciega, y finalmente se muestra la importancia de estos estudios antes de evaluar el potencial de estos aislamientos como agentes de control microbiano de esta plaga.

## 5.1 Literatura citada

Bischoff J., F., S. A. Rehner and R. A. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. The Mycological Society of America, Lawrence. 101(4): 512-530.

Bidochka M., J. and Ch. Small. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an Insect Pathogenic Fungus. *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press. 2: 28-50.

Castrillo L.,A., L. S. Bauer, H. Liu, M. H. Griggs and J.D. Vandenberg. 2010. Characterization of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) isolates associated with *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) populations in Michigan. Biol. Control. 54: 135-140.

Fargues J and P.H.Robert. 1985. Persistence of conidia of 4 entomopathogenic hyphomycetes in soil, *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor. *Nomuraea rileyi* (F) Samson and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise), in controlled conditions. Agronomie. 5: 73-80.

Meyling N., V. and J. Eilenberg. 2006. Occurrence and distribution of soil entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. Agric. Ecosyst. Environ. 113: 336-341.

Meyling N.,V. and J. Eilenberg. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. Biological Control 43: 145-155.

Meyling N., V., M. Lübeck, E.P.Buckley, J. Eilenberg and S. A. Rehners. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. Molecular Ecology. 18. 1282-1293.

Rehner S., A., A.M. Minnis, Gi-Ho Sung, J.J. Luangsa-ard, L. Devetto and R.A. Humber. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycologia 103: 1055-1073.

Rehner S., A. and E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97: 84-98.

Tymon A. and J. K Pell. 2005. ISSR, ERIC and RAPD techniques to detect genetic diversity in the aphid pathogen *Pandora neoaphidis*. *Mycol. Res.* 109: 285- 293

## ANEXO

**Cuadro 16. Numeros de acceso al GenBank para aislamientos de *Beauveria* de los Clados A, B, C, D, E y F. y  $\beta$ -tubulina.**

ARSEF	Identificación	País	Hospedante clase: Orden	Tamaño de conidial ( $\mu$ m)	ITS GenBank	EF1- $\alpha$ GenBank	B-tubulina Gen Bank
<i>Clado A</i>							
733	<i>B. bassina</i>	Brazil	Coleóptera: Curculionidae	1.9-2.7 x 1.7-2.2	AY532044	AY531953	
816	<i>B. bassina</i>	Francia	Coleóptera: Curculionidae	2.3-3.3 x 2.3-3.2	AY532053	AY531962	
812	<i>B. bassina</i>	Colombia	Coleóptera: Curculionidae	1.8-2.5 x 1.7-2.2	AY532054	AY531963	
1398	<i>B. bassina</i>	Francia	Coleóptera: Curculionidae	1.9-2.9 x 1.9-2.5	AY531979	AY531888	
2040	<i>B. bassina</i>	Korea	Coleóptera: Curculionidae	2.2-2.5 x 2.0-2.5	AY532001	AY531910	
4021	<i>B. bassina</i>	Dinamarca	Coleóptera: Curculionidae	2.1-2.5 x 2.1-2.5	AY532024	AY531933	
6721	<i>Cordyceps staphylinidaecola</i>	Korea	Coleóptera: Cerambicidae	2.1-2.4 x 2.0-2.3	AY532034	AY531943	
6722	<i>Cordyceps staphylinidaecola</i>	Korea	Hemíptera: Pentatomidae	2.1-2.4 x 2.0-2.3	AY532035	AY531944	
842	<i>B. bassina</i>	Colombia	Coleóptera: Curculionidae	1.8-2.5 x 1.7-2.2	AY532054	AY531963	
<i>Clado B</i>							
1431	<i>B. brongniartii</i>	Filipinas	Coleóptera: Cerambicidae	3.1-3.8 x 2.1-2.5	AY531980	AY531880	
1678	<i>B. bassina</i>	Japón	Coleóptera: Cerambicidae	3.8-4.2 x 2.7-3.3	AY531988	AY531897	
4362	<i>Beauveria</i> sp.	Japón	suelo	3.5-3.9 x 2.1-2.5	AY532025	AY531934	
4384	<i>B. brongniartii</i>	China	Coleóptera: Escarabaeidae	4.2-4.6 x 2.3-2.5	AY532026	AY531935	
4474	<i>B. brongniartii</i>	China	Coleóptera: Eacarabaeidae	4.2-4.8 x 2.3-2.5	AY532026	AY531935	
4850	<i>B. brongniartii</i>	Corea	Coleóptera: Eacarabaeidae	4.2-5.9 x 2.7-3.8	AY532028	AY531937	
<i>Clado C</i>							
813	<i>B. bassina</i>	Francia	Coleóptera: Curculionidae	2.9-3.7 x 2.1-2.7	AY532052	AY531961	
2544	<i>B. bassina</i>	México	Homóptera Cicadidae.	2.7-3.1 x 2.5-2.9	AY532005	AY531914	
2857	<i>B. bassina</i>	México	Lepidóptera	2.5-3.2 x 2.5-2.9	AY532009	AY531818	
4933	<i>B. bassina</i>	Francia	Coleóptera: Escolitidae	2.3-3.1 x 2.1-2.9	AY532029	AY531938	
<i>Clado D</i>							

1567	<i>B. bassiana</i> (Rehnerer y Buckley, 2005)	Suecia	Coleóptera: Escolitidae	3.7-5.2 x 1.9-2.3	AY531986	AY531894	
2251	<i>B. amorpha</i> (Rehnerer y Buckley, 2005)	Brazil	Coleóptera	3.5-4.2 x 2.1-2.5	AY532003	AY531912	
2567	<i>B. caledonica</i> (Rehnerer y Buckley, 2005)	Escocia	Suelo		AY532006	AY531915	
2922	<i>B. vermicornia</i> (Rehnerer y Buckley, 2005)	Chile	Suelo		AY532012	AY531920	
<i>Clado E</i>							
1685	<i>Beauveria</i> sp.	Japón	Coleóptera: Escarabaeidae	3.1-4.4 x 2.5-3.1	AY531990	AY531899	
7043	<i>Cordyceps staphylinidaecola</i>	Corea		3.1-4.3 x 2.5-3.2	AY532039	AY531948	

**Cuadro17. Números de acceso al GenBank para aislamientos de *Beauveria* de los Clados A, B, C, D, E y F. y *B-tubulina*.**

ARSEF	Identificación	País	Hospedante clase: Orden	Tamaño de conidial (µm)	ITS GenBank	EF1-α GenBank	B-tubulina Gen Bank
<i>Clado E</i>							
7044	<i>Cordyceps staphylinidaecola</i>	Corea		3.0-4.4 x 2.5-3.2	AY532040	AY531949	
5689	<i>Cordyceps staphylinidaecola</i>	China	Coleóptera: Escarabaeidae	3.0-4.4 x 2.5-3.2	AY532030	AY531939	
<i>Clado F</i>							
1969	<i>B. bassiana</i>	Perú	Coleóptera:		AY531998	AY531907	
2641	<i>B.amorpha</i>	Brazil	Himenóptera: Formicidae	3.2-5.2 x 1.7-2.5	AY532008	AY531917	
EFCC2533	<i>Cordyceps</i> cf. <i>Scarabaeicola</i>	Nepal			AY532058	AY531967	
ITCC4521	<i>B. bassiana</i>						DQ090736.1
BCC 14482	<i>Cordyceps bassiana</i>						EF411263.1
MRCIF21	<i>B. brongniartii</i>						EU604121.1
MRCIF50	<i>Cordyceps militaris</i>						EU604116

**Cuadro18. Números de acceso al GenBank para aislamientos de *Beauveria bassiana* que fueron estudiados.**

AISLAMIENTO	Identificación	País	Hospedante	Tamaño de conidio(µm)	ITS	EF1- $\alpha$	B-tubulina
GC03	<i>Beauveria bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.267-4.212 X 1.188-3.219	JN379790	JN617941	JN617909
GC04	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.698- 4.262 X 1.408-4.051	JN379791	JN617942	JN617910
GC05	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.626-5.163x1.315-4.416	JN379792	JN617943	JN617911
GC06	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.408-4.707 X 1.154-4.234	JN379793	JN617944	JN617912
GC07	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.607- 4.901 X 1.425-4.412	JN379794	JN617945	JN617913
GC08	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.088- 4.909 X 0.912-4.136	JN379795	JN617946	JN617914
GC09	<i>b. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.061- 5.653 X 0.986-5.032	JN379796	JN617947	JN617915
GC010	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.11-4.685 X 0.93 -4.189	JN379797	JN617948	JN617916
GC011	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.133-4.82 X 1.022-4.168	JN379798	JN617949	JN617917
GC012	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.142-5.69 X 0.979-4.831	JN379799	JN617950	JN617918
GC013	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.188-3.675 X 0.852-2.779	JN379800	JN617951	JN617919
GC014	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.939- 3.642 X 1.833-2.533	JN379801	JN617952	JN617920
GC015	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.802-3.199 X 1.559-2.761	JN37980	JN617953	JN617921
GC016	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.682-4.205 X 1.603-3.793	JN379803	JN617954	JN617922
GC018	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.145- 3.198 X 0.901-2.054	JN379805	JN617955	JN617924
GC019	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.145-5.415 X 0.901-3.937	JN379806	JN617956	JN617925
GC020	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	1.088-3.9 X 0.93-3.384	JN379807	JN617957	JN617926
Bb1	<i>B. bassiana</i>	México	Hymenoptera		JN379809	JN617958	JN617928
Bb2	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Scyphophorus acupunctatus</i>		JN379810	JN617959	JN617929
GHA	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>		JN37981	JN617960	JN617930
Bb88	<i>B. bassiana</i>	México	<i>Hypothenemus hampei</i>		JN379812	JN617961	JN617931

**Cuadro 19. Números de acceso al GenBank para aislamientos de *Metarhizium* que fueron usados para comparar.**

ARSEF	Identificación	País	Hospedante clase: Orden	Tamaño de conidios (µm)	ITS GenBank	EF1-α GenBank	B-tubulina Gen Bank
324	<i>Metarhizium acridum</i>	Australia	Ortóptera	5.0-7.5 x 3.0-4.5			EU248812
727	<i>Metarhizium robertsii</i>	Brasil	Ortóptera	5.0-7.0 x 2.0-3.5		DQ463994	EU248816
1015	<i>M. majus</i>	Japón	Lepidóptera	10.0-14.5 x 2.5-4.0		EU248866	EU248838
1914	<i>M. majus</i>	Filipinas	Coleóptera	10.5-13.0 x 2.5-4.0		EU248868	EU248840
1946	<i>M. majus</i>	Filipinas	Coleóptera	10.5-13.5 x 3.0-4.0		EU248867	EU248839
2107	<i>M. brunneum</i>	USA	Coleóptera	4.5-7.5 x 2.0-3.0		EU248855	EU248826
2133	<i>M. flavoviridae</i>	Rep. Czech	Coleóptera			DQ463999	EU248827
2808	<i>M. majus</i>	Filipinas	Coleóptera			EU248871	
3210	<i>M. pingshaense</i>	India	Coleóptera			DQ463995	EU248819
4124	<i>M. frigidum</i>	Australia	Coleóptera	4.5-7.5 x 2.5-3.5		DQ464002	EU248828
4152	<i>M. brunneum</i>	Australia	Suelo	5.0 – 7.0 x 2.5-3.5			EU248824
4179	<i>M. brunneum</i>	Australia	Suelo	5.5-8.0 x 2.0-3.0		EU248854	
4321	<i>M. guizhouense</i>	Australia	Suelo	5.5-8.0 x 2.5-3.5		EU248860	EU248832
4342	<i>M. pingshaense</i>	Islas Salomón	Coleóptera	4.5-7.0 x 2.0-3.0		EU248851	EU248821
4628	<i>M. lepidiotae</i>	Australia	Suelo	6.0-7.5 x 2.5-3.5			EU248835
4739	<i>M. robertsii</i>	Australia	Suelo			EU248848	EU248817
5714	<i>M. guizhouense</i>			7.0-9.0 x 2.0-3.0		EU248856	EU248829
6238	<i>M. guizhouense</i>	China	Lepidoptera	6.5-8.0 x 2.5-3.0			EU248830
7450	<i>M. anisopliae</i>	Australia	Coleóptera			EU248852	EU248823
7486	<i>M. acridum</i>	Nigeria	Ortóptera	4.0-5.5 x 3.0-4.0			EU248813
7487	<i>M. anisopliae</i>	Eritrea	Orthoptera	5.0 -7.0 x 2.0-3.5		DQ463996	EU248822
7412	<i>M. lepidiotae</i>	Australia	Coleóptera			EU248864	EU248836
7488	<i>M. lepidiotae</i>	Australia	Coleóptera			EU248865	EU248837
7501	<i>M. robertsii</i>	Australia		5.0-7.5 x 2.0-3.0			EU248818
CNXJ3	<i>M. anisopliae</i>				FJ589644		
NLWN	<i>M. anisopliae</i>				FJ545325		

2575	<i>M. robertsii</i>				HM055443		
2134	<i>M. robertsii</i>				HM055442		
2974	<i>M. brunneum</i>				HM055438		
820	<i>M. brunneum</i>				HM055437		
2162	<i>M. pingshaense</i>				HM055447		
977	<i>M. guizhouense</i>				HM055445		
703	<i>M. guizhouense</i>				HM055444		
CG320	<i>M.majus</i>				EF051725.1		

**Cuadro 20. Números de acceso al GenBank para aislamientos de *Metarhizium*, que fueron estudiados.**

AISLAMIENTO	Identificación	País	Hospedante	Tamaño de conidio(μm)	ITS	EF1- <i>α</i>	<i>B</i> -tubulina
GC01	<i>M. pinshaense</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	5.91-9.953 x 2.209-4.494	JN256670	JN617962	JN617932
GC02	<i>M. pinshaense</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	5.064-9.085 x 2.123-4.255	JN256667	JN617963	JN617933
MGC06	<i>M. pingshaense</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	5.12-12.28 x 1.86-6.03	JN256668	JN617964	JN617934
MGC07	<i>M. anisopliae</i>	México	<i>Phyllophaga</i> sp.	3.332-9.545 x 1.625-5.892	JN256671	JN617965	JN617935
LBIH	<i>M. robertsii</i>	México	Homoptera		JN256669	JN617966	JN617936
Ma65	<i>M. anisopliae</i>	México	<i>Aneolamia posticata</i>		JN256672	JN617967	JN617937
Ma68	<i>M. anisopliae</i>	México	<i>Aneolamia posticata</i>		JN256675	JN617968	JN617938
Ma129	<i>M. anisopliae</i>	México	<i>Tetranychus urticae</i>		JN256673	JN617969	JN617939
Ma130	<i>M. anisopliae</i>	México	<i>Tetranychus urticae</i>		JN256674	JN617970	JN617940