



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OBTENCIÓN DE UN MARCADOR MOLECULAR  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL HONGO  
ENTOMOPATÓGENO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

BIÓL. CAROLINA ANGÉLICA BRUNNER MENDOZA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:  
DRA. MARÍA DEL ROCÍO ALICIA REYES MONTES  
DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de marzo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **BRUNNER MENDOZA CAROLINA ANGÉLICA** con número de cuenta **510020819**, con la tesis titulada "**OBTENCIÓN DE UN MARCADOR MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HONGO ENTOMOPATÓGENO *METARHIZIUM ANISOPLIAE***". realizada bajo la dirección de la: **DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA**.

Presidente: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR  
Secretario: DRA. MARÍA DEL ROCÍO ALICIA REYES MONTES  
Suplente: DRA. MARÍA LUCÍA TAYLOR DA CUNHA E MELLO  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de abril de 2012

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la Universidad Autónoma de México (UNAM)

Al programa de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el apoyo económico recibido con número de CVU/Becario: 346729/239950

### **Al comité tutorial:**

Con profundo respeto, admiración y gratitud a:

La **Dra. Concepción Toriello Nájera** por todo el tiempo que ha dedicado a compartir sus enseñanzas en la ciencia y en la vida.

La **Dra. Rocío Reyes Montes** por su apoyo, enseñanzas y observaciones en este proyecto.

La **Dra. Ma. Carmen Calderón Ezquerro** por su tiempo, sus enseñanzas, sus observaciones en la realización de este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Existen muchas personas que me he encontrado en este camino y para mi fortuna han compartido no únicamente sus conocimientos y su tiempo, sino también su sincera amistad.

A la **Dra. Tere Mier**, quien me guío hasta aquí, por creer en mí, le estaré eternamente agradecida.

A **Hortensia Navarro Barranco** quien ha sido una increíble compañera de trabajo, una maestra, pero sobre todo una amiga incondicional.

A **Laura Flores Villegas** una chica como pocas, gracias por todas tus enseñanzas amiga, por tu tiempo y por hacerme reír y pasar un buen rato.

A **Miguel Ángel Ayala Zermeño**, por tu amistad y tu infinita paciencia.

A **Guadalupe Frías de León** por brindarme tú amistad, correcciones y por hacerme pasar ratos divertidos en el laboratorio.

A **Arisdel** por brindarme tu amistad y confianza.

A la **Dra. Ana Luisa Anaya Lang**, **Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor**, **Dra. María Lucia Taylor da Cunha e Mello**, por el tiempo invertido en revisar el borrador de mi tesis y todas sus acertadas observaciones para mejorarla.

A todos los chicos de otros laboratorios que me han apoyado con consejos y haciendo mas amena mi estancia Toño, Raúl, Jorge.

## DEDICATORIA

A mi OHANA

A mi Inmortal Amor

**“So schnell du auch fliehst,  
So weit du auch kommst  
Trägst du mich mit dir  
Wohin du auch gehst,  
Was immer du tust  
Ich bin ein Teil von dir”**

(Tan rápido como corras  
En la distancia en donde estás  
Me llevas contigo  
A donde quiera que vayas  
Lo que sea que hagas  
Yo soy una parte de ti)

## ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Aislados	17
Reactivación	18
Caracterización fenotípica	19
Extracción de DNA	19
Cuantificación de DNA	20
Amplificación de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA	21
Estandarización de las condiciones de PCR	22
Purificación de los productos de PCR	22
Secuenciación de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA	23
Alineamiento de las secuencias	23
Diseño del marcador molecular (sonda de DNA)	24
Sensibilidad del marcador molecular (sonda de DNA) diseñado	24
Especificidad del marcador molecular (sonda de DNA) diseñado	25
Análisis del alineamiento de las secuencias	25
RESULTADOS	26
Reactivación de los cultivos monospóricos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
Caracterización fenotípica	26
Obtención y cuantificación de DNA de los aislados de <i>M. anisopliae</i>	27
Amplificación de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA	28
Estandarización de las condiciones de PCR	29
Alineamiento de las secuencias y diseño del marcador molecular (sonda de DNA)MEAN	31
Sensibilidad de la sonda MEAN	33
Especificidad de la sonda MEAN	35
Diseño de marcador molecular (sonda de DNA) MAMX	35
Estandarización de condiciones de PCR para oligonucleótidos MAMX	36
Sensibilidad de la sonda MAMX	38
Especificidad de la sonda MAMX	39
Análisis del alineamiento de las secuencias	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	51
Anexo 1: Lista de oligonucleótidos para sonda MEAN	51
Anexo 2: Lista de secuencias emitidas por BLAST para sonda MEAN	54
Anexo 3: Secuencia consenso y lista de oligonucleótidos para sonda MAMX	57
Anexo 4: Lista de secuencias emitidas por el programa BLAST para sonda MAMX	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b>	Esquema general del mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos (modificado de Charnley y St. Leger, 1991).	5
<b>Fig. 2.</b>	<i>Metarhizium anisopliae</i> . (A) Aspecto macroscópico de la colonia en medio de agar-papa-dextrosa (APD) a los 10 días de crecimiento. (B-C) Morfología del conidióforo, fialides, conidios y columnas de conidios (Watanabe, 1994; Barron, 1983).	6
<b>Fig. 3.</b>	Mapa de los estados ganaderos y productores de azúcar.	8
<b>Fig. 4.</b>	Daños de la mosca pinta o salivazo de los pastos. (A) Pastizal seco de ganado con la plaga de la mosca pinta; (B) Aspecto de salivazo en hojas de pasto.	9
<b>Fig. 5.</b>	Región amplificada por los primer TW81 y AB28 partiendo del extremo final 3' de la subunidad 18S-ITS1-5.8S-ITS2 hasta el 28S del rDNA.	21
<b>Fig. 6.</b>	<i>M. anisopliae</i> EH-473/4 en APD, antes y después de la reactivación.	26
<b>Fig. 7.</b>	Características de <i>M. anisopliae</i> (EH-473/4). (A) Colonia de 15 días en medio de APD. (B) Conidios del hongo, tinción con azul de algodón, 400 X.	27
<b>Fig. 8.</b>	Conidios de tres especies de <i>Metarhizium</i> . (A) <i>M. anisopliae</i> de México aislado EH-467/6; (B) <i>M. robertsii</i> cepa 2575 y (C) <i>M. pingshaense</i> cepa 7929. Tinción con azul de algodón, 400 x.	27
<b>Fig. 9.</b>	Cuantificación del DNA en aislados de <i>M. anisopliae</i> de México. T= testigo negativo; extremo derecho curva de fago $\lambda$ de 10 a 100 ng. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.8 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	28
<b>Fig. 10.</b>	Productos de PCR de los aislados de <i>M. anisopliae</i> con oligonucleótidos TW81 y AB28. M = marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	28
<b>Fig. 11.</b>	Productos de PCR de los aislados de <i>M. anisopliae</i> con los oligonucleótidos TW81 y AB28 con diferentes temperaturas de alineamiento. (A) Tm de 56 °C (B) Tm de 57 °C. (C) Tm de 58 °C. M = marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	29
<b>Fig. 12.</b>	Curva de MgCl <sub>2</sub> . M = marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.2 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	30
<b>Fig. 13.</b>	Productos de PCR de los aislados de <i>M. anisopliae</i> de México con las condiciones estandarizadas. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = Testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	30
<b>Fig. 14.</b>	Alineamiento de secuencias parciales de nucleótidos de aislados de <i>M. anisopliae</i> de México y aislados de <i>M. anisopliae</i> reportados por Driver <i>et al.</i> (2000). La columna izquierda corresponde al nombre de cada uno de los aislados. La regla que se encuentra encima de la secuencias muestra la posición de los nucleótidos. El asterisco en amarillo (*) indica las posiciones que tiene un solo nucleótido totalmente conservado. La ausencia de éste indica un cambio de nucleótido en la secuencia.	31
<b>Fig. 15.</b>	Alineamiento de secuencias parciales de nucleótidos de aislados de <i>M. anisopliae</i> de México. La columna izquierda corresponde al nombre de cada uno de los aislados. La regla que se encuentra encima de la secuencias muestra la posición de los nucleótidos El asterisco en amarillo (*) indica las posiciones que tiene un solo residuo totalmente conservado. La ausencia de éste indica un cambio de nucleótido en la secuencia.	32
<b>Fig. 16.</b>	Secuencia consenso obtenida del alineamiento de los aislados de <i>M. anisopliae</i> de México.	32

<b>Fig. 17.</b>	Sensibilidad de la sonda MEAN. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	34
<b>Fig. 18.</b>	Especificidad de la sonda MEAN. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	35
<b>Fig. 19.</b>	Estandarización de condiciones de PCR con oligonucleótidos MAMX. <b>(A)</b> Curva de MgCl <sub>2</sub> <b>(B)</b> Curva de DNA. M = Marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.2 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	37
<b>Fig. 20.</b>	Productos de PCR de los aislados de <i>M. anisopliae</i> de México con los oligonucleótidos MAMXF1 y MAMXR2. M = marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder, T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.2 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	37
<b>Fig. 21.</b>	Sensibilidad de la sonda MAMX. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.	38
<b>Fig. 22.</b>	Especificidad de la sonda MAMX. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min con bromuro de etidio.	39
<b>Fig. 23.</b>	Dendrograma utilizando las secuencias de <i>M. anisopliae</i> de México, secuencias del género <i>Metarhizium</i> reportadas por Driver <i>et al.</i> (2000) y secuencias de cinco taxones de <i>Metarhizium</i> , todas obtenidas con los oligonucleótidos TW81 y AB28. <b>Azul:</b> Aislados de <i>M. anisopliae</i> de México; <b>Amarillo:</b> Aislados de <i>M. anisopliae</i> usados por Driver <i>et al.</i> , (2000); <b>Rojo:</b> Especies diferentes a <i>Metarhizium anisopliae</i> . <i>M. robertsii</i> (2575), <i>M. pingshaense</i> (7929), <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (FI-985), <i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i> (1914), y <i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> (FI-147).	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Principales características de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	6
<b>Tabla 2.</b>	Clasificación del género <i>Metarhizium</i> con base en caracteres morfológicos, análisis molecular y multigénico.	7
<b>Tabla 3.</b>	<i>M. anisopliae</i> aislados de la mosca pinta ( <i>Aenolamia</i> spp.) en cultivos de caña de azúcar de México.	16
<b>Tabla 4.</b>	Cepas de referencia del género <i>Metarhizium</i> utilizadas en el trabajo.	17
<b>Tabla 5.</b>	Cepas de hongos para ensayos de especificidad.	17
<b>Tabla 6.</b>	Programa de amplificación por PCR de oligonucleótidos TW81 y AB28.	22
<b>Tabla 7.</b>	Oligonucleótidos MEAN.	33
<b>Tabla 8.</b>	Programa de amplificación por PCR de oligonucleótidos MEANF1 y MEANR2.	33
<b>Tabla 9.</b>	Oligonucleótidos MAMX.	36

## RESUMEN

En México, *Metarhizium anisopliae* es un hongo patógeno de diversos órdenes de insectos entre los que se encuentran plagas de cultivos agrícolas como la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae) que afectan principalmente cultivos de caña de azúcar y pastizales. Este hongo se produce comercialmente en diversos países como agente microbiano de control biológico. Antes de su uso como insecticida biológico se deben considerar los protocolos de bioseguridad en el ambiente, así como la realización de estudios sobre el monitoreo del destino de los agentes microbianos en el campo, para poder entender la ecología de este grupo de microorganismos y llevar a cabo un control biológico más eficiente.

Debido a la dificultad que implican los métodos micológicos convencionales para aislar el hongo de las muestras de campo, es necesario el empleo de métodos que faciliten la detección del hongo en el ambiente, como por ejemplo, una sonda de DNA que identifique el hongo de manera sencilla, rápida y eficiente. En el presente trabajo se planteó la obtención de una sonda de *M. anisopliae* aislada de la mosca pinta de los pastos de México, utilizando para su diseño la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA, la cual ha sido ampliamente usada en hongos para diseño de marcadores moleculares y para estudios filogenéticos. Se utilizaron 13 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* obtenidos de *Aeneolamia* spp. provenientes de diferentes estados de México, y cepas de referencia de diversos orígenes geográficos. Se probó la sensibilidad y especificidad de la sonda con los 13 aislados y cepas de referencia de *M. anisopliae*, otras especies de *Metarhizium*, diversos hongos entomopatógenos y otros hongos patógenos. Se obtuvo la sonda MAMX de *M. anisopliae* que amplificó una banda de 188 bp, la cual presentó una elevada sensibilidad de hasta 500 fg/ $\mu$ l. En cuanto a la especificidad, la sonda no sólo identificó aislados de *M. anisopliae*, sino que también a *M. pingshaense* y *M. robertsii*, sugiriendo que estos tres aislados pudieran pertenecer a la misma especie. Además, la sonda no amplificó la banda específica en diversos hongos entomopatógenos ni en otros hongos patógenos que se utilizaron en las pruebas de especificidad. Los resultados muestran la relevancia del diseño y uso de sondas de DNA obtenidas de cepas autóctonas de la región donde se van a utilizar.

## SUMMARY

In Mexico, *Metarhizium anisopliae* is a fungal pathogen of different orders of insects among which are pests of agricultural crops as the spittlebug (Hemiptera: Cercopidae) affecting mainly sugar cane crops and cattle pastures. This fungus is produced commercially in several countries as a mycopesticide. Before its use as a biological insecticide, there are biosafety protocols concerning the fate of microbial agents in the environment as well as their monitoring in the field to be performed, in order to understand the basic ecology of this group of microorganisms and to carry out a more efficient biological control. Due to the complexity of the mycological conventional methods for isolating the fungus from field samples to be able to perform the biosafety procedures, it would be necessary to have other methods that would simplify the fungal detection in the field, i.e., a DNA probe able to detect the microorganism introduced into the environment.

In the present work, a specific probe for the detection of *M. anisopliae* isolated in Mexico was designed by use of sequence data from the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S rDNA region, which has been widely used in the Fungi kingdom to design molecular markers for phylogenetic and identification studies. Thirteen monospore cultures of *M. anisopliae* from different states of Mexico and reference strains from diverse geographic origins were used. The sensitivity and specificity of the marker were tested with the 13 *M. anisopliae* isolates and reference strains, other *Metarhizium* species, different entomopathogenic fungi and other pathogenic fungi. The MAMX probe assay amplified a 188 bp band with a high sensitivity, detecting 500 fg/  $\mu$ l. The DNA probe identified not only *M. anisopliae*, but also *M. pingshaense* and *M. robertsii*, suggesting that they could belong to the same species. Results showed the relevance of native or autochthonous strains for the design and use of molecular markers.

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población humana requiere la conversión de ecosistemas naturales en agroecosistemas con el fin de satisfacer principalmente sus necesidades alimenticias, buscando que éstos sean altamente productivos, sustentables y de bajo impacto para el ambiente (Badii y Guajardo, 2009). Sin embargo, la tendencia hacia el uso único y excesivo de plaguicidas químicos es aun persistente. Una parte de la solución a este problema es el control biológico, el cual puede ser definido como el uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas (Greathead y Waage, 1983). A pesar del éxito que ha tenido la introducción del control biológico es difícil predecir las consecuencias del mismo, por lo que se requieren más estudios de la ecología y epidemiología de los agentes microbianos utilizados con este fin, para su mejor comprensión y manejo (Huffaker y Dahlsten, 1999). Entre los agentes microbianos utilizados en el control biológico, se encuentran los hongos entomopatógenos, que en condiciones naturales tienen la capacidad de biorregular a las poblaciones de insectos.

Esta capacidad depende de la susceptibilidad del hospedero. En este caso, el insecto (hospedero) puede ejercer una presión selectiva que favorezca a pocos genotipos del patógeno; es decir hay una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al hospedero (St Leger y Roberts, 1997).

La habilidad de los entomopatógenos para infectar insectos está usualmente restringida a un grupo particular, por esta razón, el desarrollo y uso de hongos como agentes microbianos para control de plagas requiere de diversos estudios considerando la selección de las cepas más adecuadas por su virulencia hacia el insecto plaga y por su elevada producción de esporas, entre otras características diversas. Entre algunas de las especies fúngicas más utilizadas para el control biológico de plagas agrícolas se encuentran: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.), *Metarhizium anisopliae* (Metschn.), *Metarhizium acridum* (Driver y Milner), *Lecanicillium lecanii* Zimm ( $\equiv$  *Verticillium lecanii* Zimm.) e *Isaria fumosorosea* Wize ( $\equiv$  *Paecilomyces fumosoroseus* Wize (Brown y Smith)).

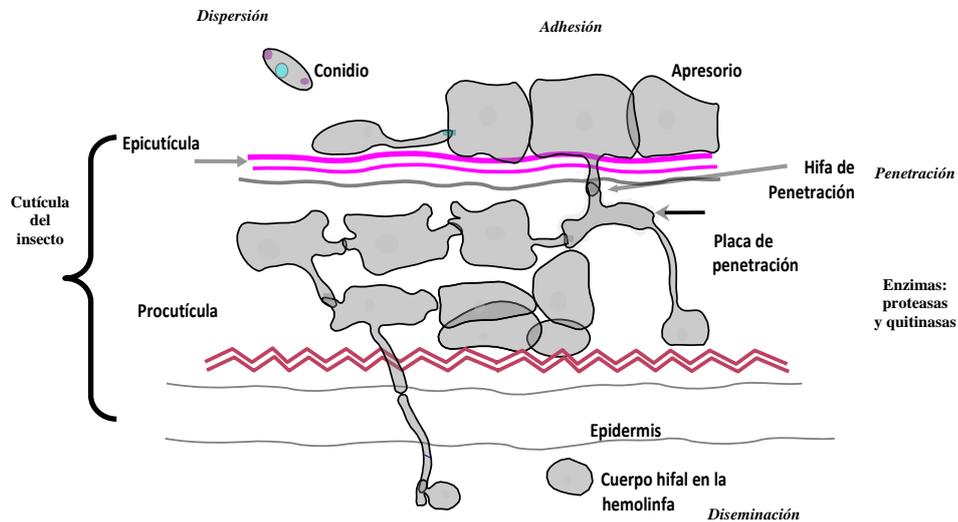
Cuando un entomopatógeno es producido en grandes cantidades, se deben cumplir ciertos protocolos de seguridad para considerar y apoyar la inocuidad de los agentes microbianos utilizados y tranquilizar las inquietudes de las personas al respecto.

El desarrollo de cualquier agente de control biológico debe ser monitoreado y manejado cuidadosamente durante su producción y aplicación en cultivos, tomando en cuenta sus riesgos potenciales y problemas de seguridad para evitar posibles daños a la salud, especialmente en vertebrados y humanos (Siegel, 1997).

Existen diversas organizaciones que han contribuido a mejorar los procedimientos para el registro de plaguicidas microbianos (bioinsecticidas). En el documento de la “Guía de Requerimientos para el Registro de Plaguicidas Microbianos” de la “Organization for Economical Co-Operation and Development” (OECD), se enlistan los puntos que de acuerdo con las autoridades que regulan las normas sobre plaguicidas de la mayoría de los países miembros de la OECD deberían conformar un expediente de un plaguicida microbiano. Entre estos puntos se encuentran los datos toxicológicos e información sobre posibles daños por la exposición al agente microbiano, estudios sobre su destino y comportamiento en el ambiente. En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es responsable de la regulación, control y fomento sanitario. A pesar de la existencia de esta Comisión, aún faltan estudios sobre el monitoreo del destino de los agentes microbianos en el campo, después de su aplicación para el control biológico, con el fin de poder entender la ecología de este grupo de microorganismos y llevar a cabo un control biológico más eficiente (Meyling y Eilenberg, 2007).

El mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos consiste en la adhesión, penetración, diseminación y salida de los conidios del hongo del insecto infectado (Charnley y St Leger, 1991) (Fig. 1). Cuando el conidio se adhiere a la superficie del insecto, éste germina desarrollando un apresorio (estructura de adhesión). La cutícula es penetrada y degradada por una combinación de presión mecánica de una clavija de penetración y la acción de enzimas, como proteasas (Pr1 y Pr2) y quitinasas. En el hemocele del insecto hospedero el hongo prolifera, posteriormente sale a la superficie, produciendo conidios que pueden ser diseminados por: viento, lluvia, otros insectos, etc. La cutícula del hospedero es la primera línea de defensa contra la infección y tiene un papel central que puede determinar la especificidad fúngica. Los insectos responden de forma celular y humoral ante una infección fúngica. Los hongos tienen dos estrategias principales para vencer la respuesta inmune del hospedero: el desarrollo de estructuras que evaden la respuesta del insecto y la producción de

sustancias inmunomodulantes que suprimen el sistema de defensa del hospedero (Thomas y Read, 2007).



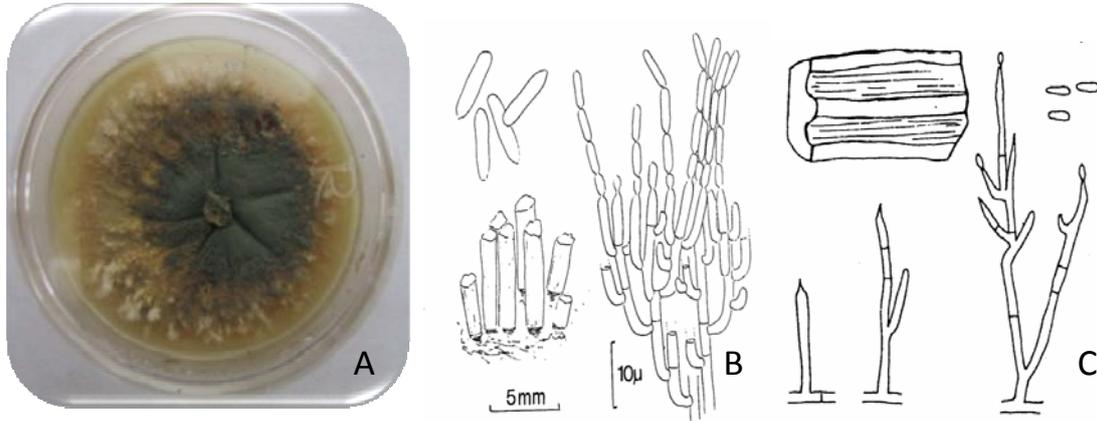
**Fig. 1.** Esquema general del mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos (modificado de Charnley y St. Leger, 1991).

El género *Metarhizium* fue descrito por Metschnikoff (1879) al observar al hongo infectando a las larvas de *Anisoplia austriaca* (Coleoptera: Rutelidae) sobre plantas de trigo, este investigador propuso el nombre de *Entomophthora anisopliae* para este hongo y posteriormente Sorokin lo transfirió al género *Metarhizium*. Su uso en el control biológico comenzó poco después de su identificación.

*Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) es un hongo entomopatógeno ampliamente utilizado como agente microbiano de control biológico. Se encuentra distribuido mundialmente con un amplio rango de insectos hospederos. Ha sido considerado seguro y ambientalmente aceptado como una alternativa a los plaguicidas químicos. En años recientes ha sido registrado como agente microbiano en diversos países como: EUA, Brasil, Venezuela, India, Australia, Kenia, Suiza, Francia, Inglaterra, Italia y Austria (Zimmerman, 2007) y está siendo aplicado en México para el control de la plaga mosca pinta o salivazo de los pastos (Hemiptera: Cercopidae) (Morales *et al.*, 1992; Berlanga *et al.*, 1997).

Estudios de termotolerancia indican que la temperatura óptima de crecimiento de los aislados de *M. anisopliae* procedentes de México es de 25 a 30 °C, lo que sugiere la

aplicación de este hongo en zonas climáticas acordes (Navarro-Barranco *et al.*, 2006). Este hongo desarrolla colonias de color verde, a veces de color sepia, y sus características morfológicas se describen en la Fig. 2 y Tabla 1 (Tulloch, 1976; Domsch *et al.*, 1980).



**Fig. 2.** *Metarhizium anisopliae*. (A) Aspecto macroscópico de la colonia en medio de agar-papa- dextrosa (APD) a los 10 días de crecimiento. (B-C) Morfología del conidióforo, fiálides, conidios y columnas de conidios (Barron, 1983; Watanabe, 1994).

**Tabla 1.** Principales características de *Metarhizium anisopliae*

Características	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin
Morfología de conidios	Basípetos catenulados, fialosporas cilíndricas
Tamaño de conidios	6.3 – 9.8 x 2.1 -2.5 µm 5.0 – 8.0 x 2.5 – 3.5 µm
Conidióforo	De 40-80 µm de alto. Simples o ramificados. Fiálides apicalmente puntiagudas de 9.7 – 35.3 x 2.1 -2.7 µm.
Hábitat	Suelos boscosos
Color de colonias	En APD de color verde amarillento. En ocasiones en tonos más oscuros de verde, sepia o isabelino.
Temperatura	25°C
Humedad Relativa (HR)	60 %

Tomado de Domsch, 1980; Barron, 1983; Watanabe, 1994.

La clasificación de este hongo ha sufrido diversas modificaciones desde que fue descrito por Tulloch (1976). El género *Metarhizium* fue reevaluado por Driver *et al.* (2000) usando la región ITS y la región 28S (D3) DNA ribosomal (rDNA) y patrones RAPD, lo cual dio como resultado que el género se agrupara en 10 distintos clados. Bischoff *et al.* (2009) realizaron uno de los últimos trabajos de análisis filogenético para *Metarhizium*, el cual se llevó a cabo con base en la secuencia casi completa de los genes que codifican para EF-1 $\alpha$ , RPB1, RPB2 y  $\beta$ -tubulina. Los resultados de este estudio apoyan la monofilia de nueve taxa terminales en el complejo de especies de *Metarhizium*. Proponiendo con rango de especie a *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum* stat. nov., *M. lepidiotae* stat. nov. y *M. majus* stat. nov., además de describir las nuevas especies *M. globosum* y *M. robertsii*. Debido a ello, en este trabajo se menciona a *M. anisopliae* var. *anisopliae* como *M. anisopliae*. En la Tabla 2 se muestran las diversas especies del género con las modificaciones de los últimos años (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación del género *Metarhizium* con base en caracteres morfológicos, análisis molecular y multigénico

Taxones reconocidos morfológicamente*	Taxones reconocidos molecularmente**	Taxones reconocidos por análisis filogenético multigénico***
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ <i>M. album</i> (Petch)</li> <li>▶ <i>M. anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin var. <i>anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin var. <i>majus</i> (Tulloch)</li> <li>▶ <i>M. flavoviride</i> (Gams y Roszypal) var. <i>minus</i> (Rombach) var. <i>flavoviride</i> (Gams y Roszypal)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ <i>M. album</i></li> <li>▶ <i>M. flavoviride</i> Tipo E</li> <li>▶ <i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i></li> <li>▶ <i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i></li> <li>▶ <i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i></li> <li>▶ <i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i></li> <li>▶ <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i></li> <li>▶ <i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i></li> <li>▶ <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i></li> <li>▶ <i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ <i>M. anisopliae</i></li> <li>▶ <i>M. guizhouense</i></li> <li>▶ <i>M. pingshaense</i></li> <li>▶ <i>M. acridum</i> stat. nov.</li> <li>▶ <i>M. lepidiotae</i> stat. nov.</li> <li>▶ <i>M. majus</i> stat. nov.</li> <li>▶ <i>M. globosum</i></li> <li>▶ <i>M. robertsii</i></li> <li>▶ <i>M. brunneum</i></li> </ul>

\*Samson *et al.* (1988), Hawksworth *et al.* (1995). Tulloch 1976, Rombach *et al.* 1986, Rombach *et al.* 1987

\*\*Driver *et al.* (2000)

\*\*\*Bischoff *et al.* (2009)

En México, *M. anisopliae* es patógeno de una gran variedad de insectos entre los que se encuentran plagas de cultivos agrícolas. Una de las principales plagas que provoca reducciones significativas en los cultivos y pastos para alimentación de ganado, es la mosca pinta o salivazo de los pastos, que comprende principalmente dos géneros: *Aeneolamia* y *Prosapia*, cada uno con varias especies. El ciclo de vida del insecto consta de tres estadios: huevo, ninfa y adulto. La denominación de salivazo de los





**Fig. 4.** Daños de la mosca pinta o salivazo de los pastos. (A) Pastizal seco de ganado con la plaga de la mosca pinta; (B) Aspecto de salivazo en hojas de pasto.

Los insecticidas químicos aplicados con mayor frecuencia para controlar la mosca pinta son: thiodan, nuvacrón y diazinón (Rodríguez, 2004), entre otros, los cuales de acuerdo con “World Health Organization (WHO)” presentan una categoría de toxicidad I Y II, ubicándolos en extremada y moderadamente tóxicos. Asimismo, son tóxicos para insectos benéficos (abejas), zooplancton, crustáceos, peces, aves y mamíferos (WHO, 2009).

La aplicación de *M. anisopliae* ha resultado ser una excelente alternativa para el control biológico de la mosca pinta, debido a la inocuidad que presenta para insectos benéficos y mamíferos. La bioseguridad de *M. anisopliae* ha sido establecida, utilizando mamíferos y modelos de vertebrados, tales como aves, peces, ratones, conejos, ratas y reptiles, desde 1968 hasta 1983 (Zimmermann, 2007). Pruebas de bioseguridad en mamíferos (roedores y conejos) utilizando inhalación, exposición subcutánea, intraperitoneal e intraocular han demostrado la inocuidad del hongo hacia los animales (Toriello *et al.*, 2006; Navarro- Barranco *et al.*, 2006).

## ANTECEDENTES

El desarrollo sustentable ha adquirido un papel relevante en el ámbito socioeconómico de las naciones en los últimos años. El control biológico ocurre de manera natural en las poblaciones de organismos sin la intervención del hombre y a esta fase se le denomina control natural. Es solo cuando el hombre interviene mediante el uso de organismos (hongos, bacterias, depredadores, etc) para controlar poblaciones consideradas plagas, que esta actividad adquiere el nombre de control biológico. Este término fue usado por primera vez por Smith en 1919 (Badii *et al.*, 2000). De forma oficial el control biológico comenzó a finales del siglo XIX con el uso de un escarabajo (*Rodalia cardinales*, Coleoptera: Coccinellidae) en contra de la escama algodonosa de los cítricos *Icerya purchasi* (Hemiptera: Margarodidae), en el estado de California, EUA y a partir de ese momento el control biológico se inició como disciplina científica (Badii *et al.*, 2000).

A pesar de que el control biológico ha sido practicado en Latinoamérica desde principios del siglo XX, los datos históricos escritos son limitados. Los principales casos de control biológico son: (1) la introducción de *R. cardinalis* para el control de *I. purchasi*; (2) la liberación de *Encarsia berlesi* (Hymenoptera: Aphelinidae) para el control de *Pseudalacaspis pentagona* (Homoptera: Diaspididae); y (3) la introducción de *Aphelinus mali* (Haldeman) (Hymenoptera: Aphelinidae) para el control de *Eriosoma lanigerum* (Hemiptera: Aphididae). En México, se empezaron a realizar trabajos de control biológico hasta 1940 con la introducción de *A. mali* para el control del pulgón lanífero del manzano *E. lanigerum* en Coahuila (Lenteren van, 2008).

Actualmente, *M. anisopliae* se aplica en México como agente de control biológico en plantaciones de caña de azúcar de la región del Golfo (SAGAR, 1999), pero no se cuenta con técnicas de identificación molecular específicas que permitan la protección de carácter jurídico sobre las cepas utilizadas como bioinsecticidas, ni el análisis económico costo-beneficio de la liberación del hongo, ni el monitoreo de la persistencia del hongo en el campo agrícola (suelo, plantas, agua y aire). Una de las principales incógnitas sobre los agentes microbianos usados en el control biológico ha sido la inconsistencia en su monitoreo debido a la falta de marcadores específicos (Bidochka, 2001; Zimmerman, 2007).

Las estrategias clásicas para la identificación de hongos entomopatógenos con base en características morfológicas y fisiológicas como macro y micromorfología, termotolerancia, velocidad de crecimiento radial y formación de propágulos infectivos, han mostrado deficiencias para la detección de hongos en el ambiente y esto ha fomentado la búsqueda de nuevas metodologías, en particular, las técnicas moleculares con las cuales se ha llegado a tener herramientas útiles para detectar e identificar agentes microbianos, incluyendo hongos entomopatógenos. Una parte importante para determinar el impacto ambiental al utilizar el control biológico, es el empleo de algún tipo de marcador para detectar al microorganismo introducido en el ambiente (Bidochka, 2001).

Actualmente existen diversas técnicas que pueden ser utilizadas para la identificación de hongos entomopatógenos. Se han combinado análisis bioquímicos con el estudio de caracteres morfológicos, mostrando gran diversidad genética en el género *Metarhizium* (St. Leger *et al.*, 1997). La biología molecular ha adquirido relevancia como herramienta para la identificación de hongos y estudios de persistencia en el ambiente (Goettel *et al.*, 2005). Para esto, se han diseñado sondas a partir de regiones codificantes y no codificantes del DNA (Unruh y Wooley, 1999). Dentro de éstas se encuentra la región amplificada de una secuencia caracterizada (SCAR) obtenida a partir de patrones polimórficos generados por la amplificación aleatoria de DNA (RAPD) y la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Con base en estas técnicas, se han diseñado sondas para la identificación de diferentes hongos. Por ejemplo, Castrillo *et al.* (2002) diseñaron una sonda de DNA para *B. bassiana*, el cual es un hongo usado para el control biológico en un amplio rango de insectos plagas. Arroyo (2005) desarrolló una sonda para *M. acridum*, una especie fúngica utilizada principalmente para el control de acrídidos. Ésta última se evaluó en una plantación de amaranto de San Mateo, Puebla, en la cual se aplicó *M. acridum* para el control del saltamontes (*Sphenarium purpurascens*, Orthoptera: pyrgomorphidae). Los conidios del hongo fueron detectados en el aire por la técnica de la PCR con la sonda específica, dos días después de su aplicación en el campo (Calderón-Ezquerro *et al.*, 2011). Asimismo, para otra especie fúngica, *I. fumosorosea* ( $\equiv$  *Paecilomyces fumosoroseus*), utilizada en el control biológico de la mosquita blanca (Hemíptera: Aleyrodidae), también se obtuvo otro SCAR (Arroyo- Vásquez *et al.*, 2007) a partir de los patrones polimórficos de la técnica de AFLP. Este SCAR se evaluó por PCR en muestras de aire, suelo e insectos, y

los resultados mostraron una detección del hongo entre  $10^1$  y  $10^5$  conidios de *I. fumosorosea* (Ayala-Zermeño *et al.*, 2011). Por otro lado, Schena *et al.* (2002) lograron la detección de *Aureobasidium pullulans* con una sonda propuesta por ellos, este hongo saprobio ha demostrado tener actividad antagonista hacia hongos fitopatógenos.

El uso de regiones del rDNA también ha sido ampliamente usado en ecología fúngica (Bidartondo y Gardes, 2005). Las secuencias del espaciador interno transcrito (ITS Inter Transcribed Spacer) del rDNA, son un blanco ideal para el desarrollo de oligonucleótidos especie-específicos debido a que evolucionan relativamente rápido y son altamente variables en longitud y contenido de nucleótidos entre especies cercanamente relacionadas, y algunas veces, dentro de las mismas especies, como ha sido demostrado por Entz *et al.* (2005) al desarrollar una sonda para la detección de *M. acridum*. Para este mismo hongo, Reyes-Montes *et al.* (2012) diseñaron una sonda a partir de las secuencias correspondientes al clado 7 reportado por Driver *et al.* (2000) que demostró una buena sensibilidad y especificidad entre las especies del género *Metarhizium*.

En vista de la necesidad de contar con herramientas moleculares obtenidas a partir de cepas autóctonas para la investigación ecológica de los hongos entomopatógenos aplicados en el ambiente, se llevó a cabo este estudio para obtener una sonda de DNA que pudiera utilizarse para este tipo de proyectos.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en Tecomán, Colima, cuenta con aislados autóctonos de *M. anisopliae* provenientes de diferentes hospederos y cultivos. Estos aislados han sido estudiados conjuntamente entre el laboratorio de Micología Básica del Depto. de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, la UAM-Xochimilco y el CNRCB, para evaluarlos fenotípicamente (Basilio-Hernández *et al.*, 2007; Montoya-Sansón *et al.*, 2006; 2007; Toriello *et al.*, 2009; Zavala-Ramírez, 2005) y genotípicamente (Navarro-Barranco, 2006). Como parte de los protocolos de bioseguridad de estos microorganismos se ha evaluado su inocuidad para los mamíferos (Toriello *et al.*, 2006) y se ha determinado su bajo riesgo infectivo para los insectos que no son el objetivo o blanco de los hongos (Zimmermann, 2007). Todos estos estudios de bioseguridad, así como la identificación del hongo, se han realizado con los métodos de micológica convencional que tienen la desventaja de ser complicados y lentos en su ejecución. Consecuentemente, se requiere ahora de un método molecular de diagnóstico específico que facilite la identificación de *M. anisopliae* en campos agrícolas donde se ha aplicado el hongo como agente microbiano de biocontrol y para estudios del hongo en la naturaleza. En este trabajo se plantea el diseño de una sonda específica con la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA, para aislados de *M. anisopliae* de México.

## **HIPÓTESIS**

Si las técnicas micológicas convencionales usadas para la identificación del hongo *Metarhizium anisopliae* en muestras del ambiente presentan dificultades para su estudio, entonces la obtención de una sonda de DNA específica y sensible para *M. anisopliae* facilitará su estudio en investigaciones posteriores.

## **OBJETIVO GENERAL**

Diseñar una sonda específica y sensible con base en la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA para la identificación del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Obtener DNA de diversos aislados de *M. anisopliae* de México y de cepas de referencia del género *Metarhizium*.
- ❖ Identificar la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA para la especie de *M. anisopliae*, en los aislados de México.
- ❖ Aislar un fragmento de la región ITS mencionada en el objetivo anterior para encontrar una secuencia consenso entre los aislados de México y *M. anisopliae* reportados por Driver *et al.* (2000) para el diseño de una sonda de DNA específica.
- ❖ Determinar la especificidad y sensibilidad de la sonda diseñada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislados

Se utilizaron 13 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* (Tabla 3) derivados de aislados originales de la mosca pinta (*Aeneolamia* spp.) de México provenientes del CNRCB, SAGARPA. Estos cultivos monospóricos se encuentran depositados en la colección de cultivos del laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México y registrada en “World Federation of Culture Collections (WFCC)” con el número BMFM-UNAM 834. Las cepas de referencia del género *Metarhizium* utilizadas están descritas en la Tabla 4 y pertenecen a las colecciones de la “Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization” (CSIRO) de Australia, y a la “Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi” (ARSEF) de United States Department of Agriculture (USDA). Para los ensayos de especificidad se utilizaron los hongos entomopatógenos *Lecanicillium lecanii* e *Isaria fumosorosea* y otros hongos patógenos de humanos como *Sporothrix schenckii* EH-143 y *Aspergillus fumigatus* MM4 (Tabla 5).

**Tabla 3.** *M. anisopliae* aislados de la mosca pinta (*Aenolamia* spp.) en cultivos de caña de azúcar de México

Clave UNAM <sup>1</sup>	Clave CNRCB <sup>2</sup>	Origen geográfico
EH-467/6	MaZC3A	Veracruz
EH-468/1	MaGBA	Veracruz
EH-469/6	MaGB3A	Veracruz
EH-470/6	MaGB4	Veracruz
EH-471/3	MaNL18	S. L. Potosí
EH-472/6	MaNP1	S. L. Potosí
EH-473/4	MaNL1	S. L. Potosí
EH-474/6	MaNL2	S. L. Potosí
EH-476/3	MaNM2	S. L. Potosí
EH-477/5	MaOPS1	Oaxaca
EH-478/1	MaOPS2	Oaxaca
EH-479/2	MaMV	Veracruz
EH-480/8	MaZP	Veracruz

<sup>1</sup>UNAM= Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>2</sup>CNRCB= Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

**Tabla 4.** Cepas de referencia del género *Metarhizium*

Nombre	Clave ARSEF* CSIRO**	Hospedero	Origen
<i>M. anisopliae</i> <sup>^</sup>	7450*	<i>Heteronyx piceus</i> (Coleoptera)	Australia
<i>M. robertsii</i> <sup>^</sup>	2575*	<i>Curculio caryae</i> (Coleoptera)	Australia
<i>M. pingshaense</i> <sup>^</sup>	7929*	<i>Cryptotermes brevis</i> (Isoptera)	Australia
<i>M. album</i> <sup>+</sup>	1941*	<i>Nephotettix virescens</i> (Homoptera)	Filipinas
<i>M. flavoviride</i> Tipo E <sup>+</sup>	2948*	Homoptera	Brasil
<i>M. f. var. novazealandicum</i> <sup>+</sup>	FI-698**	Lepidoptera	Nueva Zelanda
<i>M. f. var. pemphigum</i> <sup>+</sup>	FI-72**	<i>Pemphigus treherni</i> (Homoptera)	Inglaterra
<i>M. f. var. minus</i> <sup>+</sup>	2037*	<i>Niliparvata lugens</i> (Homoptera)	Filipinas
<i>M. f. var. flavoviride</i> <sup>+</sup>	1184*	<i>Otiorhynchus sulcatus</i> (Coleoptera)	Francia
<i>M. a. var. acridum</i> <sup>+</sup>	FI-985**	<i>Austracis guttulosa</i> (Orthoptera)	Australia
<i>M. a. var. acridum</i> <sup>+</sup>	FI-987**	<i>Ornithacris cavroisi</i> (Orthoptera)	Nigeria
<i>M. a. var. lepidiotum</i> <sup>+</sup>	FI-147**	<i>Lepidiotia consobrina</i> (Coleoptera)	Australia
<i>M. a. var. anisopliae</i> <sup>+</sup>	FI-1029**	<i>Schistocerca gregaria</i> (Orthoptera)	Eritrea
<i>M. majus</i> <sup>+</sup>	1914*	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	Filipinas

\*ARSEF= Agricultural Research Service of Entomopathogenic fungi, EUA

\*\*CSIRO= Commonwealth Scientific and Industrial research Organization, Australia

+ Driver *et al.* (2000)

<sup>^</sup> Bischoff *et al.* (2009)

**Tabla 5.** Cepas usadas para ensayos de especificidad

Clave UNAM	Clave original	Taxon	Hospedero	Origen
EH-348	Aislado C <sup>1</sup>	<i>Lecanicillium lecanii</i>	Trialeurodes sp. (Homoptera: Aleyrodidae)	Morelos, MX
EH-458	IE-397 <sup>2</sup>	<i>L. lecanii</i>	Hemileia vastatrix	Veracruz, MX
EH- 506/3	PFCAM	<i>Isaria fumosorosea</i>	Bemisia spp.	Campeche, MX
EH- 511/3	AMBAS2	<i>I. fumosorosea</i>	Bemisia spp.	Armería, Colima, MX
EH- 143	EH- 143	<i>Sporothrix schenckii</i>	Caso clínico humano	MX
MM4	951740	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Caso clínico humano	AR

MX= México

AR= Argentina

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.

<sup>2</sup> Herbario XAL, Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz

## Reactivación

Los cultivos monospóricos se obtuvieron de conservación en glicerol (10 %), sin embargo, no todos los aislados mostraban las características típicas de la morfología de la especie por lo cual se procedió a reactivarlos mediante la infección de ninfas estadio cinco de *Meccus pallidipennis* (Hemíptera).

- **Suspensión conidial para infección del insecto:** Se sembraron tubos con medio de agar papa dextrosa (APD: 300 g/L papa blanca, 20 g/L dextrosa-Droguería Cosmopolita, México-, 15 g/L agar -Bioxon, México-) con los 13 aislados de *M. anisopliae* mostrados en la Tabla 2. Éstos fueron incubados a 28 °C durante 8 días. Se preparó entonces una suspensión conidial de  $1 \times 10^7$  conidios/mL de cada aislado.
- **Serie de lavados:** Para asegurar el crecimiento del hongo de interés, los insectos fueron sometidos a una serie de lavados con el fin de eliminar agentes externos. Estos lavados consistieron en sumergir las ninfas en agua estéril, hipoclorito al 5 %, agua estéril nuevamente, alcohol al 70 %, y tres lavados con agua estéril, cada uno de ellos durante 3 s.
- **Infección del insecto:** Todo el procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. Cada insecto se colocó individualmente en cajas Petri con papel filtro estéril, se aplicaron 10 µL del inóculo en el pronoto del insecto, y una vez infectados se mantuvieron a 27 °C con un fotoperiodo de 12:12 h (luz - oscuridad). Posteriormente, cada insecto se depositó en cajas con agar agua para brindar soporte y mantener una humedad adecuada (60 % aprox.). La muerte de las ninfas por la infección del hongo fue constatada al observar su crecimiento en la superficie del triatomino. Los insectos se mantuvieron en las condiciones antes descritas de humedad y luz-oscuridad, durante 15 días, o hasta que el hongo cubriera la superficie del insecto.
- **Recuperación de *M. anisopliae* de *M. pallidipennis*:** Para la recuperación del hongo, se tomó muestra de conidios y masa miceliar de la superficie dorsal del insecto con un asa micológica y se sembró en cajas Petri con APD. Se incubaron durante 8 días a 28 °C y todos los cultivos fueron examinados al microscopio para verificar su identidad y pureza.

## Caracterización fenotípica

**Macromorfología.** Los aislados de *M. anisopliae* se sembraron en cajas de Petri con medio APD y se incubaron a 28 °C durante cinco días. Posteriormente, se observaron las características morfológicas coloniales de cada cultivo (textura y color de la superficie de la colonia). Para el registro de los aislados se tomaron fotografías con una cámara digital (Sony, CA, EUA).

**Micromorfología.** Algunos aislados de *M. anisopliae* se analizaron mediante la técnica de microcultivo (Ridell, 1950) para observación de su morfología microscópica característica. La técnica consistió en cortar bloques de 1 cm<sup>2</sup> de medio APD. Cada bloque se colocó sobre un portaobjetos estéril y se inoculó el aislado correspondiente, sobre el bloque se colocó un cubreobjetos estéril y se incubó dentro de una caja de Petri a 28 °C durante cinco días. Se separó cuidadosamente el cubreobjetos del agar y se depositó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observó al microscopio (Olympus CH2, NY, EUA), con el fin de analizar las características morfológicas de los conidios (tamaño, color y forma). Las características microscópicas de los aislados fueron registradas por medio de una cámara digital (Olympus DP11, NY, EUA).

- **Tamaño de conidios.** Se midió con un micrómetro ocular calibrado (Olympus CH2), el largo y ancho de 10 conidios de algunos aislados de *M. anisopliae* cultivados en APD e incubados a 28 °C durante cinco días. Se documentaron con una cámara digital (Olympus DP11).

## Extracción de DNA

Después de haber identificado, tanto micro como macroscópicamente cada aislado, éstos fueron cultivados individualmente en 250 mL de medio líquido de extracto de levadura al 1 % (Universal Flavors; México), peptona de soya al 1 % (Bioxon; México) y dextrosa al 4 % (Droguería Cosmopolita, México). Se incubaron en baño María con agitación a 28 °C por tres días. Para obtener el micelio se filtró y lavó con agua estéril y posteriormente fue secado con papel filtro en campana de flujo laminar en condiciones estériles y conservado a -45 °C hasta su utilización.

Para el proceso de extracción se utilizó el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, Austin, TX, EUA) de la siguiente manera: se tomaron 100 mg de masa micelial húmeda y se depositaron en microtubos de 1.5 mL con 0.2 g de perlas de vidrio de 425-600  $\mu\text{m}$  (Sigma,) estériles y el amortiguador de extracción AP1 del kit. Los tubos se agitaron en el equipo FastPrep (Thermo Savant Instruments, Holbrook, NY, EUA) y se realizaron pruebas para definir la velocidad y tiempos óptimos de agitación, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de masa fúngica fragmentada. El método que se utilizó para el rompimiento de la pared del micelio del hongo fue el propuesto por Lee *et al.* (1990); Williams *et al.* (2001); Calderón *et al.* (2002). Brevemente consistió en la adición de 4  $\mu\text{L}$  de RNasa a 100 mg/mL, se agitó en el vortex y se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C. Después de 10 min se adicionaron 130  $\mu\text{L}$  del amortiguador AP2, se incubaron por 5 min en hielo y se centrifugaron durante 5 min a 13,200 rpm. Se transfirió el volumen total del sobrenadante a la columna QIAshredder mini spin del kit sostenida en un tubo colector de 2 mL para centrifugarse a 13,200 rpm por 2 min. El sobrenadante obtenido en el tubo colector se transfirió a un nuevo tubo y se adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E mezclando con una micropipeta. Se transfirieron 650  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugaron durante 1 min a 9,000 rpm desechando el sobrenadante obtenido. Este paso se repitió hasta finalizar con el volumen requerido. Posteriormente, se cambió el tubo colector, y se realizaron dos lavados con 500  $\mu\text{L}$  del amortiguador AW, el primero se centrifugó por 1 min a 9,000 rpm y el segundo por 2 min a 13,200 rpm. Por último, la columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, adicionándole a la membrana 50  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 9,000 rpm para su elución.

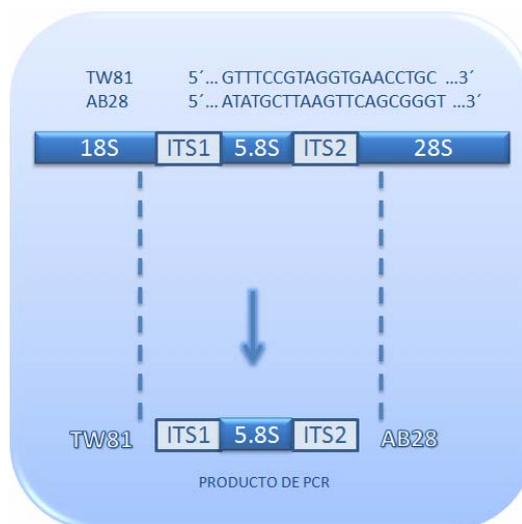
### **Cuantificación de DNA**

Para la cuantificación de DNA se realizó la electroforesis en gel de agarosa (al 0.8 % con 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromuro de etidio), en amortiguador 0.5 X (tris base a 1.34 M, ácido bórico a 0.45 M y EDTA a 0.025 M). Se colocaron cuatro concentraciones (10, 20, 50 y 100 ng) del fago  $\lambda$  (Invitrogen, CA, EUA) y en los siguientes carriles una mezcla de 2  $\mu\text{L}$  de DNA de cada aislamiento y 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25 %, xilencianol al 0.25 %, ficol 400 al 25 %). La electroforesis se efectuó a 100 V por 20 min. Para capturar la imagen del gel se usó un equipo Gel Doc<sup>TM</sup> XR Imaging System (Bio-Rad, CA, EUA). El DNA de cada uno de los aislados de *M. anisopliae* se

diluyó para la obtención de una concentración final de 5 ng/μL para su utilización durante la amplificación por PCR.

### **Amplificación por PCR de la región 18S- ITS1- 5.8S- ITS2- 28S**

Se utilizó el método de PCR empleando los oligonucleótidos TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Sigma, México) que amplifican un fragmento de 601 bp (Fig. 5), previamente probados por Curran *et al.* (1994), y Driver *et al.* (2000).



**Fig. 5.** Región amplificada por los primer TW81 y AB28 partiendo el extremo final 3' de la subunidad 18S-ITS1-5.8S-ITS2 hasta el 28S del rDNA

Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo de acuerdo con lo reportado por Curran *et al.* (1994) en un volumen final de reacción de 25 μL. Se emplearon: amortiguador de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> a 2.5 mM, dNTPs a 200 μM (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA), 100 pmoles/μL de cada oligonucleótido AB28 y TW81, 10 ng de DNA genómico y 1 U Taq polimerasa (Applied Biosystems). El testigo negativo contenía todo lo anterior excepto el DNA genómico. La amplificación se realizó en un Esco swift® Maxi™ Thermal Cycler Block (Esco healthcare, Singapur) con el programa mostrado en la tabla 6.

**Tabla 6.** Programa de amplificación por PCR de oligonucleótidos TW81 y AB28

1 x	Ciclo 1	94°C x 5 min
30 x	Ciclo 2	94°C x 1 min 55°C x 30 s 68°C x 30 s
1x	Ciclo 3	68°C x 2 min

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio (10 µg/mL), en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Base a 45 mM, ácido bórico a 45 mM, EDTA a 1 mM) (Curran *et al.*, 1994).

### **Estandarización de las condiciones de PCR**

Para conocer las condiciones óptimas para la amplificación, se realizaron:

- **Curva de amplificación.** Se llevó a cabo una curva de diferentes temperaturas de alineamiento para elegir la temperatura óptima de alineamiento, llevando a cabo la PCR bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.
- **Curva de MgCl<sub>2</sub>.** Se realizó una curva de MgCl<sub>2</sub> con las concentraciones de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM, llevando a cabo la PCR bajo las mismas condiciones antes mencionadas y analizando por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

### **Purificación de los productos de PCR**

Después de amplificar los fragmentos del DNA de los diferentes aislados de *M. anisopliae*, se purificaron los productos obtenidos por PCR. La purificación consistió en colocar el volumen de la mezcla de reacción (aproximadamente 20 µL) de cada tubo junto con 2 µL de amortiguador de carga, en un gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5 X, durante un tiempo aproximado de 90 min. Una vez concluida, se observaron los geles a través de un transiluminador de luz UV y se escindió la banda del gel de agarosa eliminando el exceso y poder depositarla en tubos Eppendorf de 1.5 mL. La purificación se realizó con el kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GMBH, Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones descritas por el fabricante. Los cortes del gel donde se mostraba la banda se pesaron en una balanza analítica para ajustar el peso que indica el kit. Se agregaron 300 µL de amortiguador QG por cada 100 mg de gel, las muestras se

incubaron a 50 °C por 10 min (o hasta la disolución total del gel), mezclándolas con vortex durante la incubación. Después de que el gel se disolviera por completo, se observó que el color de la mezcla fuese amarillo ya que la adsorción de DNA a la membrana QIAquick es eficiente sólo a pH 7.5 (el color amarillo es un indicador del pH adecuado en la mezcla). Se colocó la columna QIAquick spin en un tubo colector de 2 mL, para unir el DNA, se agregaron 800 µL de la muestra en la columna QIAquick y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm. El líquido colectado fue desechado, posteriormente se adicionaron 500 µL de amortiguador QG a la columna QIAquick (para la remoción de posibles restos de agarosa) y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Posteriormente, para lavar la muestra, se agregaron 750 µL de amortiguador PE del kit a la columna y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Se desechó el líquido colectado y fue centrifugado nuevamente durante 1 min a 13,000 rpm para remover por completo el etanol residual del amortiguador PE, se colocó la columna QIAquick en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril para eluir el DNA, se agregaron 30 µL de agua MilliQ y se mantuvo la columna por 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, obteniéndose así el DNA purificado de la amplificación previa.

### **Secuenciación de la región 18S- ITS1- 5.8 S- ITS2- 28S del rDNA**

Una vez purificados los productos de amplificación de la región de interés de los 13 aislados de *M. anisopliae*, se secuenciaron en un sólo sentido, en un secuenciador ABI (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, CA, EU), en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los electroferogramas de las secuencias obtenidas fueron editados con el programa Chromas ver. 2.33 (<http://www.technelysium.com.au>).

### **Alineamiento de las secuencias**

Para el alineamiento se utilizaron las secuencias reportadas por Driver *et al.*, (2000) correspondiente al clado 9, utilizando como herramienta de análisis el programa Clustal X (ver. 1.83). Para su edición se utilizó el programa Bioedit (Sequence Alignment Editor). Con el propósito de descartar homologías con secuencias de otros hongos se realizó una búsqueda con el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.23 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997). Se compararon con todas las secuencias de nucleótidos pertenecientes a los hongos depositados en el GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) hasta ese momento. Como criterio se consideró la búsqueda de

secuencias de la colección de nucleótidos (nr/nt), optimizada para secuencias altamente similares (megablast) con el fin de determinar si existía algún organismo diferente a *Metarhizium anisopliae* que tuviera la misma secuencia.

### **Diseño del marcador molecular (sonda de DNA)**

Para el diseño de los oligonucleótidos, se introdujo la región homóloga del alineamiento de los aislados de *M. anisopliae*, perteneciente al clado 9 de Driver *et al.* (2000), empleando diversos programas: primer BLAST (primer designing tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), DNAMAN software (Lynnon Biosoft, Québec City, Canadá). Se tomó como base para el diseño de los oligonucleótidos los siguientes parámetros: una longitud de 18 a 20 bp, un porcentaje de guanina-citosina entre 40 a 60 %, una temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>) entre 57 a 62 °C. Además de estas características los oligonucleótidos debían ser 100 % complementarios al molde de DNA, no autocomplementarse, ni formar estructuras secundarias que impidieran el alineamiento de los oligonucleótidos al molde de DNA, evitar secuencias ricas en polipirimidinas (Timina, Citosina) y polipurinas (Adenina, Guanina), contar con residuos de GC en el extremo 3' del oligonucleótido, zonas GC en el extremo 5' y regiones centrales, para dar mayor estabilidad a la hibridación del oligonucleótido con su secuencia diana. Se llevó a cabo el mismo procedimiento, para la obtención de las dos sondas.

### **Sensibilidad del marcador molecular (sonda de DNA) diseñado**

Para la prueba de sensibilidad del marcador diseñado se realizaron diluciones seriadas con las siguientes concentraciones de DNA del aislado EH- 473/4 de *M. anisopliae*: 10, 5 y 1 ng; 1000, 500, 100, 50 y 10 pg; 1000, 500, 100, 50, 10 y 1 fg. La mezcla de reacción fue realizada en un volumen de 25 µL con las condiciones mencionadas con anterioridad. La amplificación se realizó en un termociclador Swift maxi ESCO® (Micro Pte Ltd ver. 1.0), bajo el mismo programa de amplificación mencionado anteriormente. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5 X teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V en amortiguador TBE. El estándar de tamaño molecular empleado fue el de 100 bp DNA Ladder. Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador Synoptics (Syngene, Cambridge, Inglaterra) utilizando el programa GeneSnap (SynGene) ver. 6.03.00. Posteriormente, se registró la

imagen del gel en formato jpg para su posterior análisis, este análisis consistió en identificar solo la banda de amplificación deseada comparándola con el marcador de peso molecular.

### **Especificidad del marcador molecular (sonda de DNA) diseñado**

La evaluación de la especificidad de la sonda se realizó usando las mismas condiciones para la PCR antes mencionadas con el aislado EH-473/4 de *M. anisopliae* de México y la cepa de referencia de *M. anisopliae* 7450, además de otras cepas de referencia del género *Metarhizium* de diversas especies, procedentes de diferentes orígenes geográficos (Tabla 3), otros hongos entomopatógenos y patógenos humanos (Tabla 4 y 5 respectivamente). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5 X teñido con bromuro de etidio. El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V en amortiguador TBE en una cámara de electroforesis. El estándar de tamaño molecular empleado fue el de 100 bp DNA Ladder. Las imágenes de los geles fueron capturadas como se mencionó anteriormente. El análisis de los resultados consistió en la visualización de la banda con el peso molecular deseado únicamente para los aislados de *M. anisopliae*.

### **Análisis del alineamiento de las secuencias**

Con el objetivo de conocer la relación existente entre los aislados de *M. anisopliae* de México y algunos aislados de *M. anisopliae* de Driver *et al.* (2000), se realizó un análisis sencillo. El alineamiento fue realizado con el programa Clustal X posteriormente para la generación del dendrograma con el programa Dendroscope 3 (ver. 3.0.13 beta).

## RESULTADOS

### Reactivación de cultivos monospóricos de *M. anisopliae*

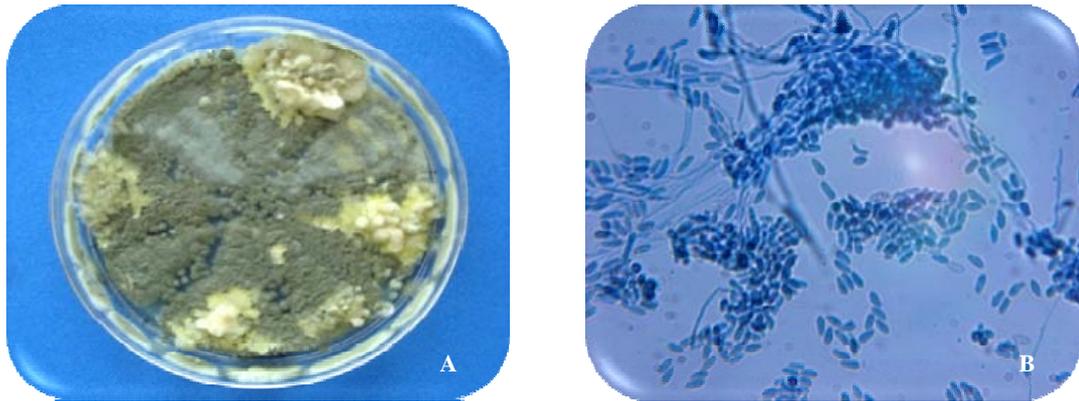
Los cultivos monospóricos se obtuvieron de la conservación de los aislados en glicerol (10 %), sin embargo, no todos mostraban las características típicas de la morfología de la especie, por lo cual se procedió a reactivarlos mediante su infección en ninfas de *Meccus pallidipennis* (Hemíptera). En la Fig.6 se puede observar una colonia del aislado EH-473/4 obtenido de conservación, en el cual se observa poca esporulación, en su mayoría estructuras miceliales y después de la reactivación se observa la colonia de *M. anisopliae*, con micelio blanco algodonoso que con el tiempo esporuló y produjo un color verde oscuro, recobrando sus características después de la infección del insecto (Fig. 6).



Fig. 6. *M. anisopliae* EH-473/4 en APD, antes y después de la reactivación

### Caracterización fenotípica

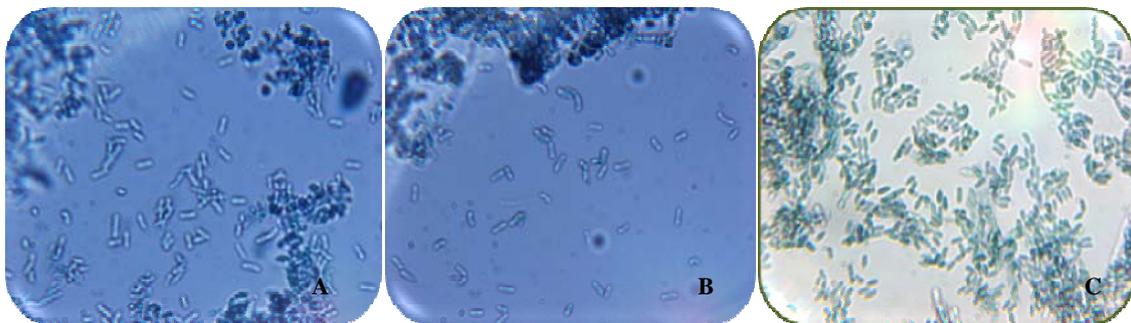
**Macro y micromorfología.** Los 13 aislados de *M. anisopliae* usados en este estudio presentaron las características propias de la especie. La muestra tomada de la colonia se observó al microscopio, mostrando conidióforos simples y ramificados con conidios basípetos, catenulados y cilíndricos que correspondían a la imagen típica de los conidios de *M. anisopliae*.



**Fig.7.** Características de *M. anisopliae* (EH-473/4). (A) Colonia de 15 días en medio de APD (B) Conidios del hongo, tinción con azul de algodón, 400 X.

### Tamaño de conidios

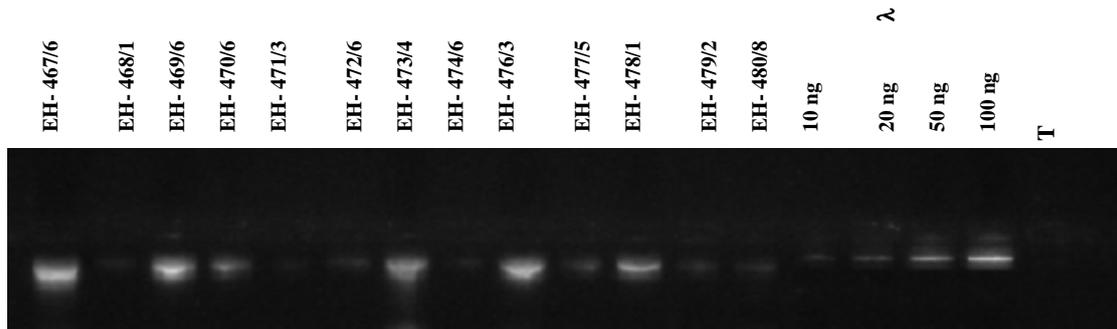
El tamaño de los conidios de algunas especies estudiadas mostraron las siguientes dimensiones: *M. anisopliae* (5.0 – 7.0 x 2.0 – 3.5  $\mu\text{m}$ ), *M. robertsii* (5.0 – 7.5 x 2.0 – 3.5  $\mu\text{m}$ ) y *M. pingshaense* (5.0 – 7.0 x 2.0 – 3.5  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 8), lo que coincide con los datos reportados por Bischoff *et al.*, (2009).



**Fig. 8.** Conidios de tres especies de *Metarhizium*. (A) *M. anisopliae* de México, aislado EH-473/4; (B) *M. robertsii*, cepa 2575 (C) *M. pingshaense*, cepa 7929. Tinción con azul de algodón, 400 x.

### Obtención y cuantificación de DNA de los aislados de *M. anisopliae*

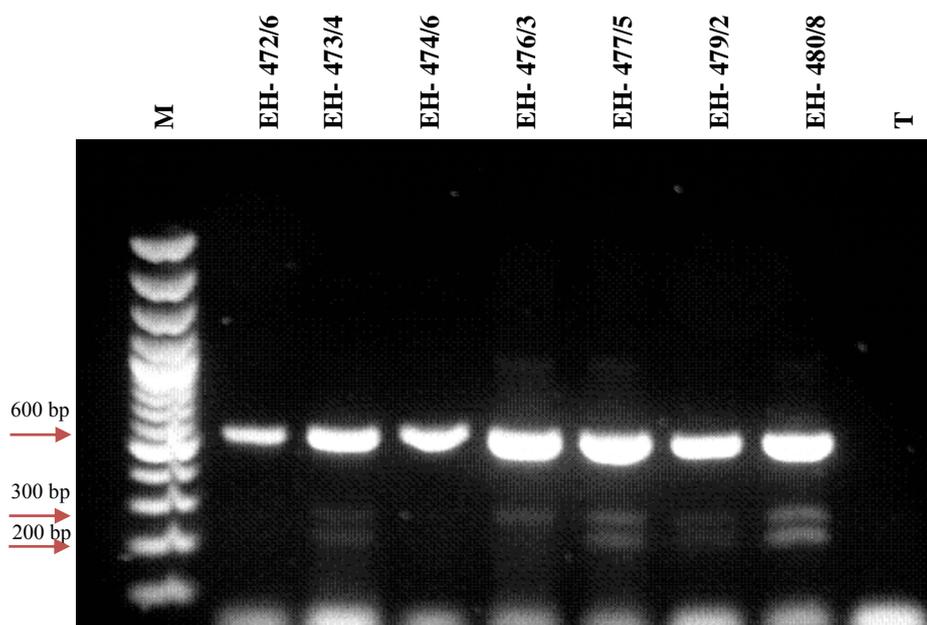
Se obtuvo el DNA de los 13 aislados monospóricos de *M. anisopliae* de México, así como de los aislados de referencia del género *Metarhizium* y de las cepas de los hongos empleados para la prueba de especificidad. La cuantificación del DNA se realizó por comparación de las muestras con la curva obtenida de las diferentes concentraciones del fago  $\lambda$  (10, 20, 50 y 100 ng/ $\mu\text{L}$ ) y fue ajustado a 5 ng/ $\mu\text{L}$ . En la Fig. 9 se observa la cantidad de DNA de los 13 aislados de *M. anisopliae* utilizados en este estudio, la cantidad que se obtuvo varió de 10 a más de 100 ng/  $\mu\text{L}$  de DNA.



**Fig. 9.** Cuantificación del DNA en aislados de *M. anisopliae* de México. T= testigo negativo; extremo derecho curva de fago  $\lambda$  de 10 a 100 ng. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.8 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

### Amplificación por PCR de la región 18S- ITS- 5.8S- ITS2- 28S del rDNA

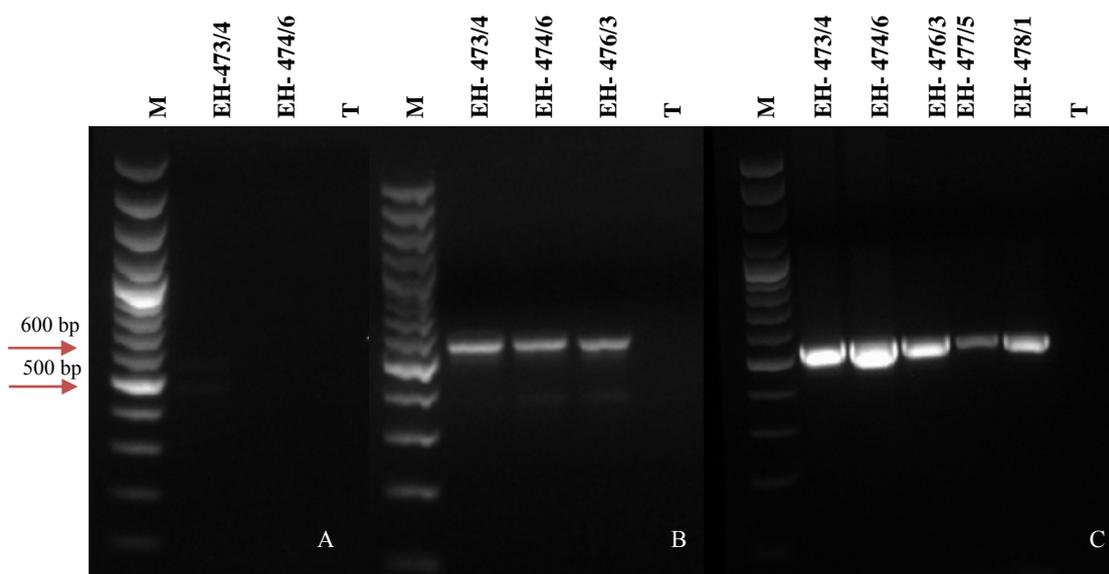
La PCR se realizó usando los oligonucleótidos TW81 y AB28 para los aislados de *M. anisopliae*. Los resultados muestran bandas con un peso molecular de 600 bp para los aislados EH-472/6 y EH-474/6, como reportado por Curran *et al.* (1994). En cuanto a los aislados EH-473/4, EH-476/3, EH-477/5, EH-479/2 y EH-480/8, la electroforesis mostró bandas inespecíficas de ~200 a 300 bp (Fig. 10), además de la banda de 600 bp, por lo que fue necesario realizar ajustes en las condiciones de la PCR para optimizar la amplificación.



**Fig. 10.** Productos de PCR de los aislados de *M. anisopliae* con oligonucleótidos TW81 y AB28. M = marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

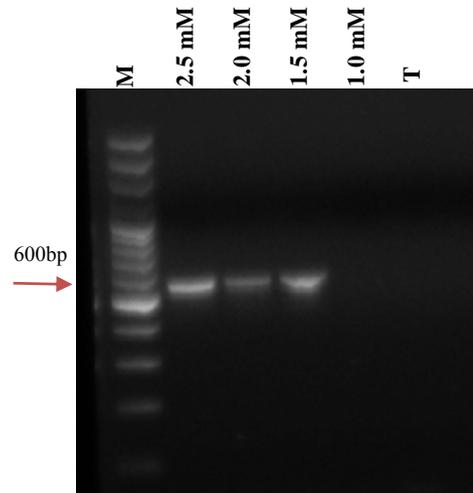
## Estandarización de las condiciones de PCR

- ♦ **Curva de amplificación:** Uno de los parámetros modificados para la optimización de las condiciones de amplificación por PCR fue la temperatura de alineamiento. Se realizaron ensayos con 56, 57 y 58 °C. La Fig. 11A muestra los resultados de la PCR con una  $T_m$  de 56 °C, se observa la amplificación de la banda de 600 bp y una banda inespecífica de ~500 bp para el aislado EH-473/4, por otro lado, no se aprecia la amplificación del aislado EH-474/ 6. La Fig. 11B muestra los resultados con una  $T_m$  de 57°C con los aislados EH-473/4, EH-474/ 6 y EH-476/ 3, presentándose nuevamente bandas inespecíficas de ~400 bp. Finalmente con 58 °C se logra una óptima amplificación usando los aislados EH-473/4, EH-474/6, EH-476/3, EH-477/5 y EH- 478/1 (Fig. 11C)



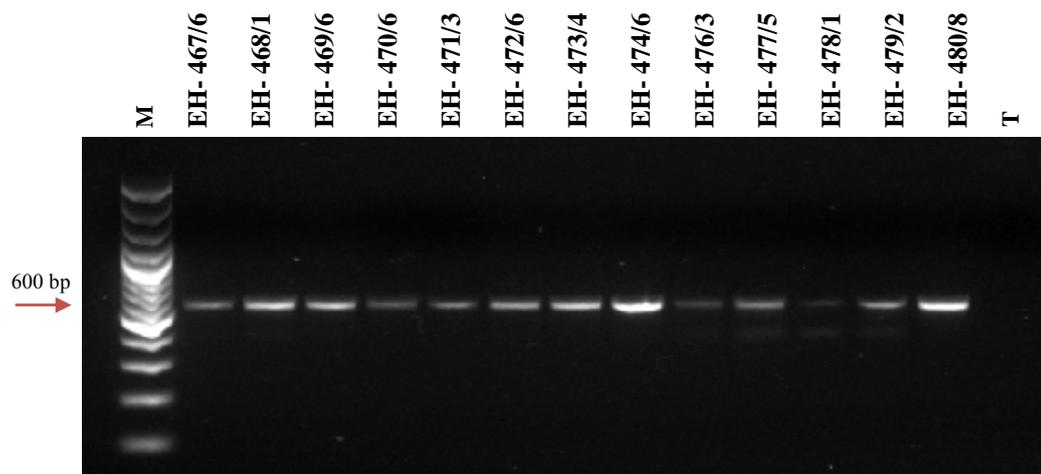
**Fig. 11.** Productos de PCR de los aislados de *M. anisopliae* con los oligonucleótidos TW81 y AB28 con diferentes temperaturas de alineamiento. (A)  $T_m$  de 56 °C (B)  $T_m$  de 57 °C (C)  $T_m$  de 58 °C. M = marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

- ♦ **Curva de MgCl<sub>2</sub>:** Con el propósito de obtener la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> y usando el aislado EH-478/1, se probaron diferentes diluciones partiendo de 2.5, 2.0, 1.5, hasta 1.0 mM. En la Fig. 12 se puede observar que no existe una variación significativa a partir de la concentración de 1.5 hasta 2.5 mM. La PCR fue realizada bajo las mismas condiciones antes descritas.



**Fig. 12.** Curva de MgCl<sub>2</sub>. M = marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.2 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

Ante los resultados anteriores, se eligieron las condiciones óptimas para la amplificación, siendo las siguientes: B10X a 1 X, dNTPs a 200 μM, MgCl<sub>2</sub> a 2.0 mM, oligonucleótidos a 100 pmoles/μL, 1 U de Taq Pol y DNA a 10 ng/2μL. Posteriormente, se procedió a la amplificación por PCR con las condiciones estandarizadas usando todos los aislados de *M. anisopliae* de México (Fig. 13).

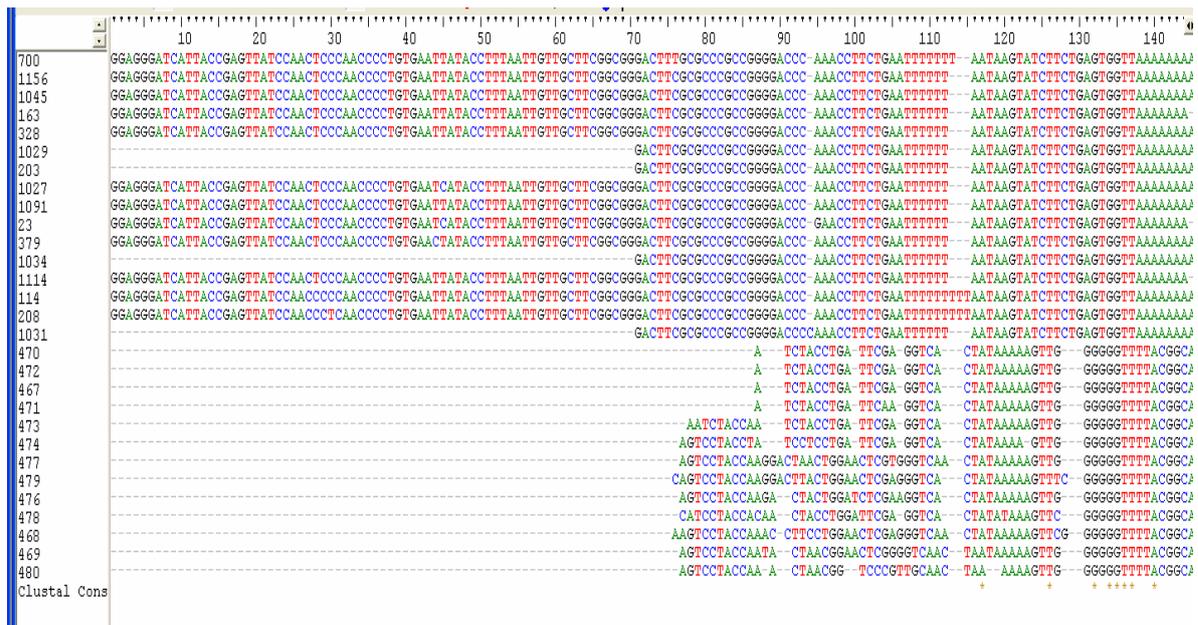


**Fig. 13.** Productos de PCR de los aislados de *M. anisopliae* de México con las condiciones estandarizadas. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = Testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

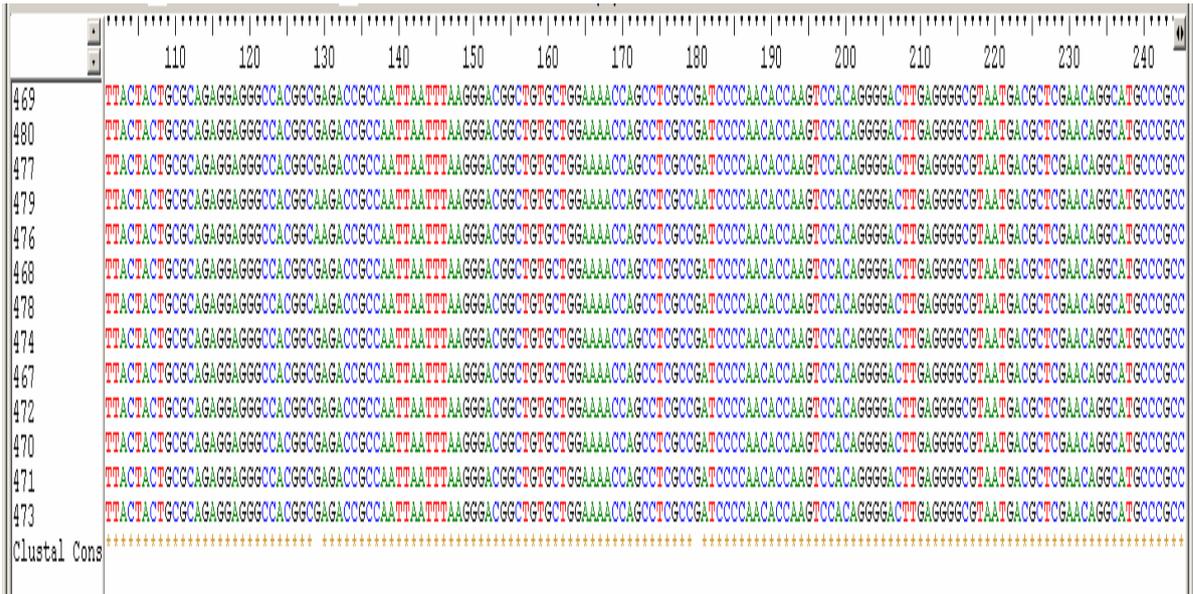
Todos los amplicones obtenidos de los aislados de *M. anisopliae* de México y de aislados de referencia del género *Metarhizium*, fueron purificados obteniendo una concentración de 10 a 20 ng. para su posterior secuenciación.

### Alineamiento de las secuencias y diseño del marcador molecular (sonda de DNA) MEAN

Los electroferogramas correspondientes a las secuencias de *M. anisopliae* de México fueron editados en el programa Bioedit, obteniendo secuencias cuyo tamaño molecular varió entre 300-500 bp. El alineamiento de las secuencias de *M. anisopliae* de México y de algunas secuencias de *M. anisopliae* reportadas por Driver *et al.* (2000) depositadas en el Genbank no mostró una región compartida lo suficientemente amplia para lograr el diseño de una sonda (Fig. 14), por lo cual el alineamiento fue realizado únicamente con las secuencias de *M. anisopliae* de México (Fig.15).



**Fig. 14.** Alineamiento de secuencias parciales de nucleótidos de aislados de *M. anisopliae* de México y aislados de *M. anisopliae* reportados por Driver *et al.* (2000). La columna izquierda corresponde al nombre de cada uno de los aislados. La regla que se encuentra encima de la secuencias muestra la posición de los nucleótidos. El asterisco en amarillo en la parte inferior (\*) indica las posiciones que tiene un solo nucleótido totalmente conservado. La ausencia de éste indica un cambio de nucleótido en la secuencia.



**Fig. 15.** Alineamiento de secuencias parciales de nucleótidos de aislados de *M. anisopliae* de México. La columna izquierda corresponde al nombre de cada uno de los aislados. La regla que se encuentra encima de las secuencias muestra la posición de los nucleótidos. El asterisco en amarillo (\*) indica las posiciones que tienen un solo nucleótido totalmente conservado. La ausencia de éste indica un cambio de nucleótido en la secuencia.

A partir de una región compartida por todos los aislados de *M. anisopliae* de México (Fig. 16) y siguiendo las características mencionadas en materiales y métodos que debían cumplir los oligonucleótidos, se realizó el diseño de la sonda con el programa DNAMAN.

```

ATCTACCTGATTGAGGTCATAAAAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGC
GCCGGGCTCCTGTTGCGAGTGTCTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGAC
CGCCAATTAATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACA
CCAAGTCCACAGGGGACTTGAGGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCA
GAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAA
TTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCG
TTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCCTCAGAAGATACTATTAATAAAATTCA
GAAGGTTCCGGTCCCCGGCGGGCGGAAGTCCCGCCGAAGCAACAATTAAGGTAT
GATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCT
TACGGAAACAAA

```

**Fig. 16.** Secuencia consenso obtenida del alineamiento de los aislados de *M. anisopliae* de México.

El programa proporcionó múltiples opciones de posibles oligonucleótidos que cumplieran con los requerimientos especificados (Anexo 1). Al ser evaluados se seleccionaron los mostrados en la Tabla 7. El nombre asignado a cada oligonucleótido hace referencia a las dos primeras letras del género *Metarhizium* (ME) y de la especie *anisopliae* (AN),

así como la indicación de la dirección del oligonucleótido “Forward” (F) y “Reverse” (R).

**Tabla 7.** Oligonucleótidos MEAN

Nombre	Secuencia	Producto de amplificación	T <sub>m</sub> (°C)
MEANF1	5'-TTACTACTGCGCAGAGGAGG	422 pb	58.3
MEANR2	5'-GGAGGGATCATTACCGAGTT	422 pb	57.9

T<sub>m</sub> = temperatura de alineamiento

Se realizó una prueba *in silico* de la secuencia flanqueada por la sonda diseñada comparándola con todas las secuencias de nucleótidos depositadas hasta ese momento en el GenBank, con el programa BLAST. Los resultados mostraron un porcentaje de similitud del 100 % con *M. anisopliae*, y con las especies *M. robertsii* y *M. pingshaense* (Anexo 2).

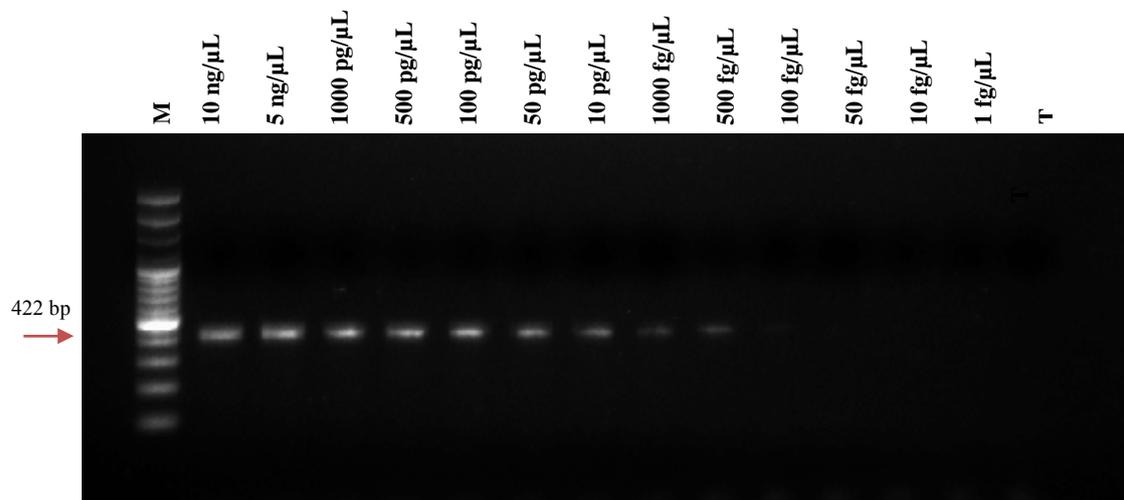
Debido al tamaño de los oligonucleótidos y porcentaje de purinas y pirimidinas que presentaban, se modificó únicamente la temperatura de alineamiento de 55 a 65 °C de las condiciones de la PCR realizadas con la región 18S-ITS1-5.6-ITS2-28S del rDNA y los oligonucleótidos TW81 y AB28 (Tabla 8).

**Tabla 8.** Programa de amplificación por PCR de oligonucleótidos MEANF1 y MEANR2

1 x	Ciclo 1	94°C x 5 min
30 x	Ciclo 2	94°C x 1 min 65°C x 30 s 72°C x 30 s
1x	Ciclo 3	72°C x 5 min

### Sensibilidad de la sonda MEAN

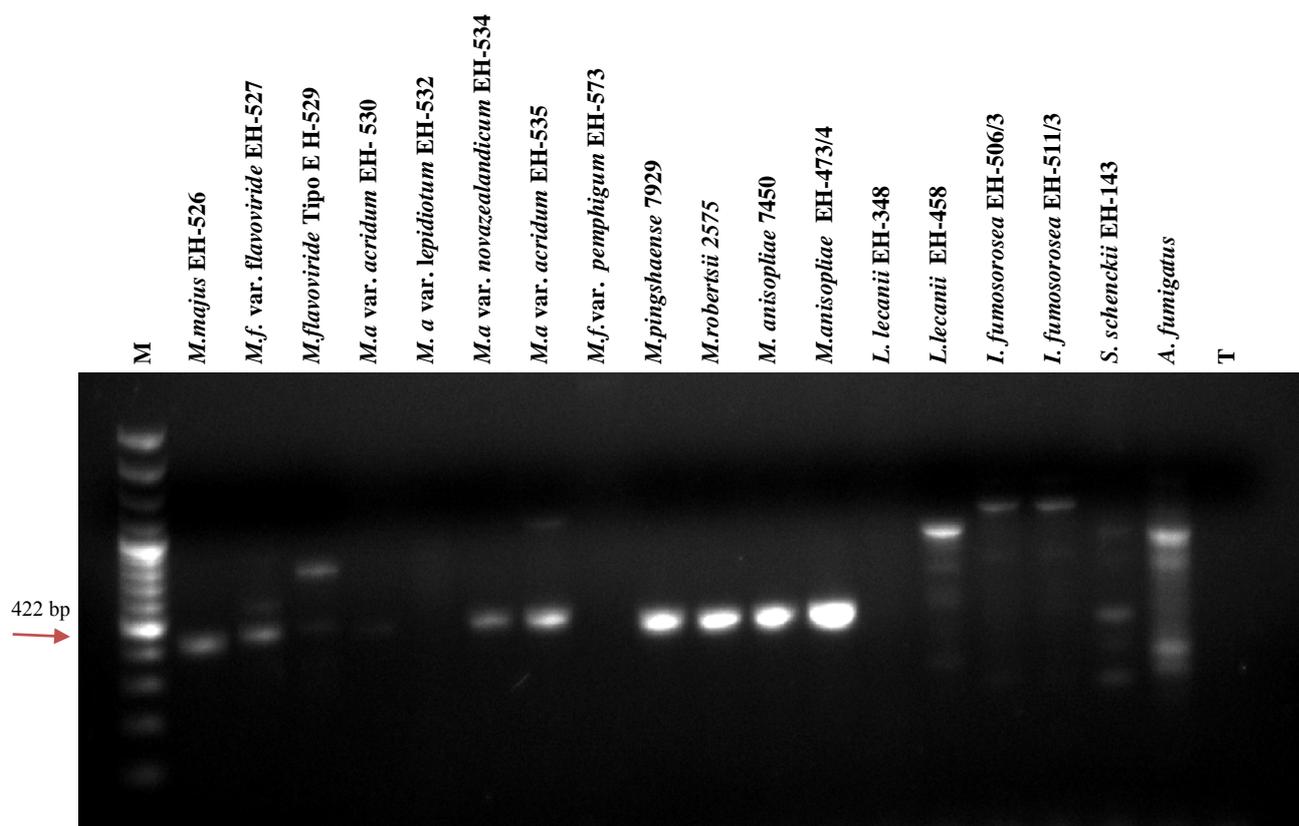
Se realizó la PCR con las condiciones descritas previamente con los oligonucleótidos MEANF1 y MEANR2, y el aislado EH-473/4 de *M. anisopliae*. Los resultados mostraron que esta sonda tiene una elevada sensibilidad, ya que detectó DNA fúngico hasta 500 fg/μL (Fig. 17).



**Fig. 17.** Sensibilidad de la sonda MEAN. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

## Especificidad de la sonda MEAN

La sonda amplificó DNA de todos los aislados de las especies del género *Metarhizium*, así como con otros hongos no relacionados (bandas inespecíficas de distinto peso molecular), con excepción de *L. lecanii* (EH-348), *M. a. var. novazealandicum* (EH-534) y *M. a. var. lepidiotum* (Fig.18), por lo que la sonda se consideró inespecífica para la identificación de *M. anisopliae*.



**Fig. 18.** Especificidad de la sonda MEAN. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

## Diseño de marcador molecular (sonda de DNA) MAMX

Con base en la región seleccionada para el diseño de la sonda MEAN, se realizó el análisis para la obtención de los oligonucleótidos, seleccionando los que se muestran en la Tabla 9 de una lista de múltiples opciones (Anexo 3). Para esta sonda, la asignación del nombre para cada oligonucleótido hace referencia a la primera letra del género *Metarhizium* (M) y la especie *anisopliae* (A), MX es la abreviatura de México, así como la indicación de la dirección del oligonucleótido “Forward” (F) y “Reverse” (R).

**Tabla 9.** Oligonucleótidos MAMX

Nombre	Secuencia	Producto de amplificación	Tm (°C)
MAMXF1	5'-GGGCTCCTGTTGCGAGTGTT	188 pb	64.9
MAMXR2	5'-CACATTGCGCCCGTCAGTAT	188 pb	64.2

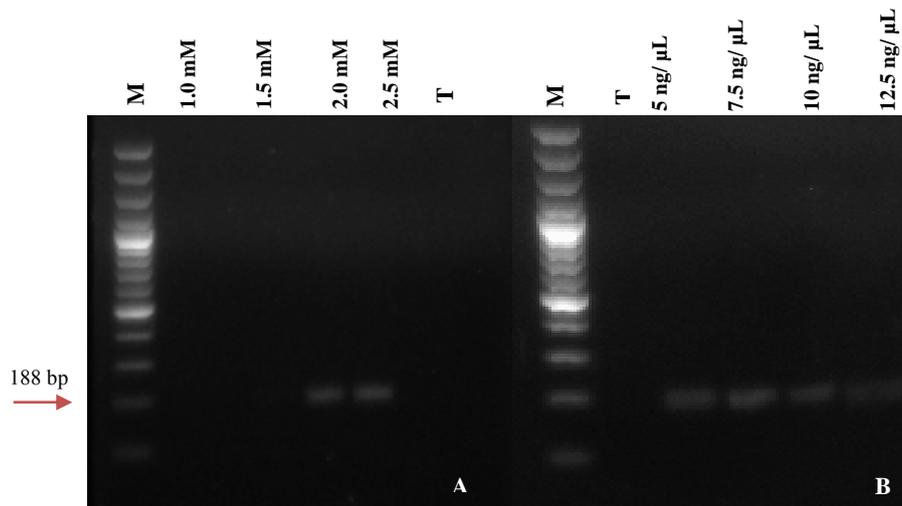
Tm = temperatura de alineamiento

Se realizó una prueba *in silico* de la secuencia flanqueada por la sonda diseñada usando el programa BLAST mostrando un porcentaje de similitud del 100% con *M. anisopliae*, y además con *M. robertsii* y *M. pinghaense* (Anexo 4). Los oligonucleótidos diseñados MAMXF1 y MAMXR2 fueron utilizados en la PCR con el programa de amplificación usado para la sonda MEAN (Tabla 8). Sin embargo, fue necesario realizar ajustes en las condiciones de la PCR.

#### **Estandarización de las condiciones de PCR para oligonucleótidos MAMX**

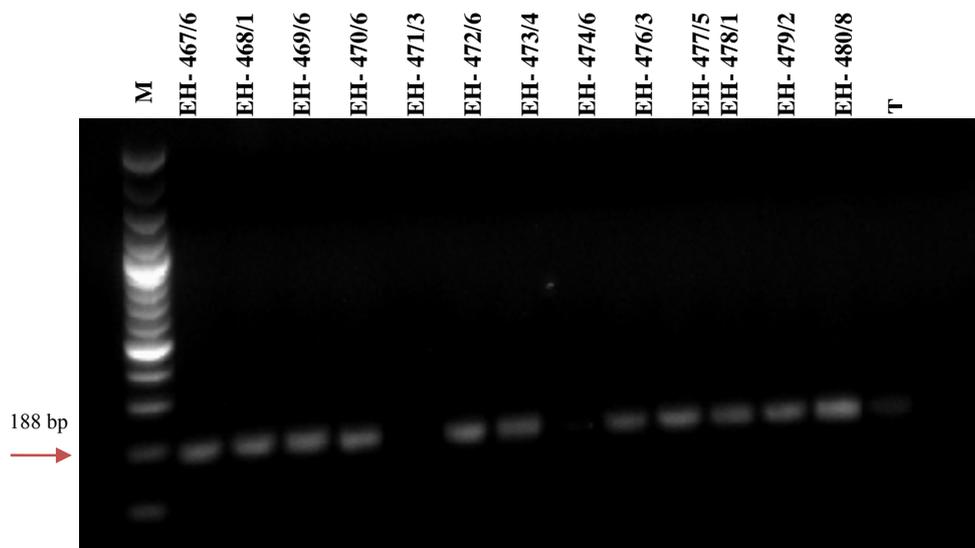
Para establecer las condiciones óptimas de la PCR se realizaron:

- **Curva de MgCl<sub>2</sub>.** Se realizó una curva de magnesio con las concentraciones de 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 mM usando el aislado EH-470/6. La PCR fue realizada bajo las condiciones de amplificación antes mencionadas. En la Fig. 19A se puede observar una óptima amplificación con una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2.0 a 2.5 mM.
- **Curva de DNA.** Se realizó una curva de DNA con las concentraciones de 5, 7.5, 10 y 12.5 ng/2 µL usando el aislado EH-470/6. La PCR se realizó bajo las condiciones de amplificación antes mencionadas. En la Fig. 19B no se aprecian cambios significativos con las concentraciones utilizadas de DNA.



**Fig. 19.** Estandarización de condiciones de PCR con oligonucleótidos MAMX. (A) Curva de  $MgCl_2$  (B) Curva de DNA; M = Marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.2 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

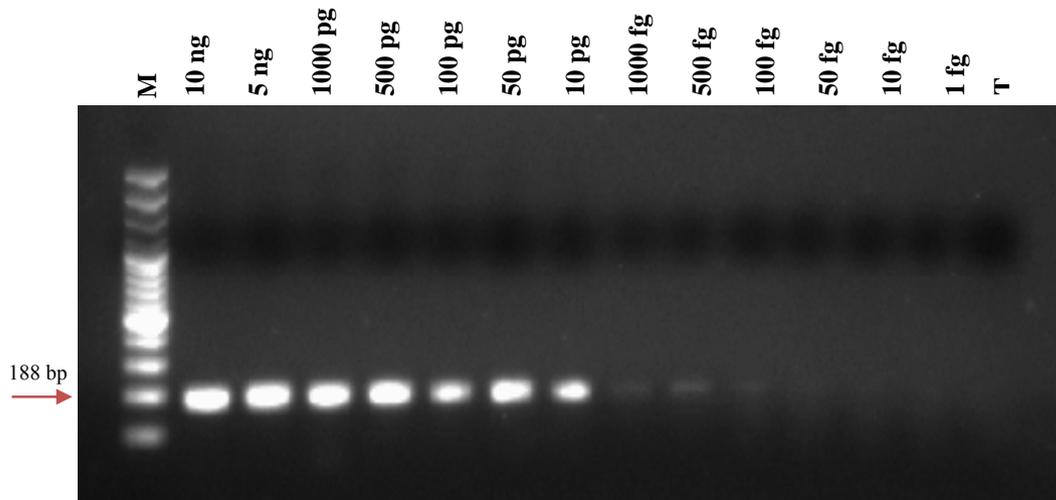
Se eligieron los parámetros con los que se obtuvo una óptima amplificación por PCR, siendo las condiciones adecuadas para la amplificación las siguientes: B10X a 1X, dNTPs a 200  $\mu$ M,  $MgCl_2$  a 2.0 mM, oligonucleótidos a 100 pmoles/ $\mu$ L, 1 U de Taq Pol y DNA a 10 ng/2 $\mu$ L. Se realizó una PCR usando los aislados de *M. anisopliae* de México. En la Fig. 20 se observa la banda de 188 bp con los parámetros ya estandarizados.



**Fig. 20.** Productos de PCR de los aislados de *M. anisopliae* de México con los oligonucleótidos MAMXF1 y MAMXR2. M = marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder, T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.2 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

### Sensibilidad de la sonda MAMX

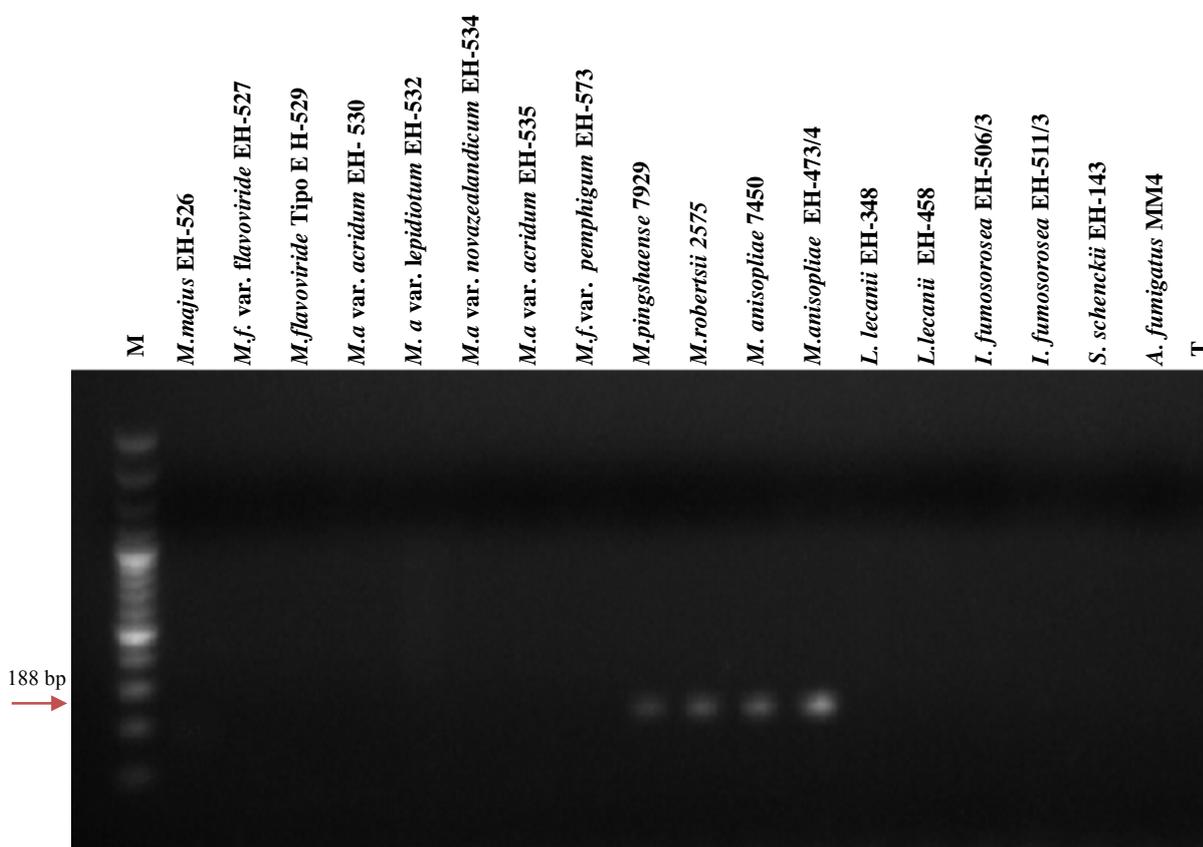
La sonda fue probada para determinar su sensibilidad utilizando el DNA del aislado EH-473/4 a diferentes concentraciones de DNA, desde 10 ng/ $\mu$ L hasta 1 fg/ $\mu$ L. En la Fig. 21 se observó que la sonda diseñada para aislados de *M. anisopliae* fue muy sensible, ya que detectó hasta 500 fg/ $\mu$ L de DNA.



**Fig. 21.** Sensibilidad de la sonda MAMX. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min, con bromuro de etidio.

## Especificidad de la sonda MAMX

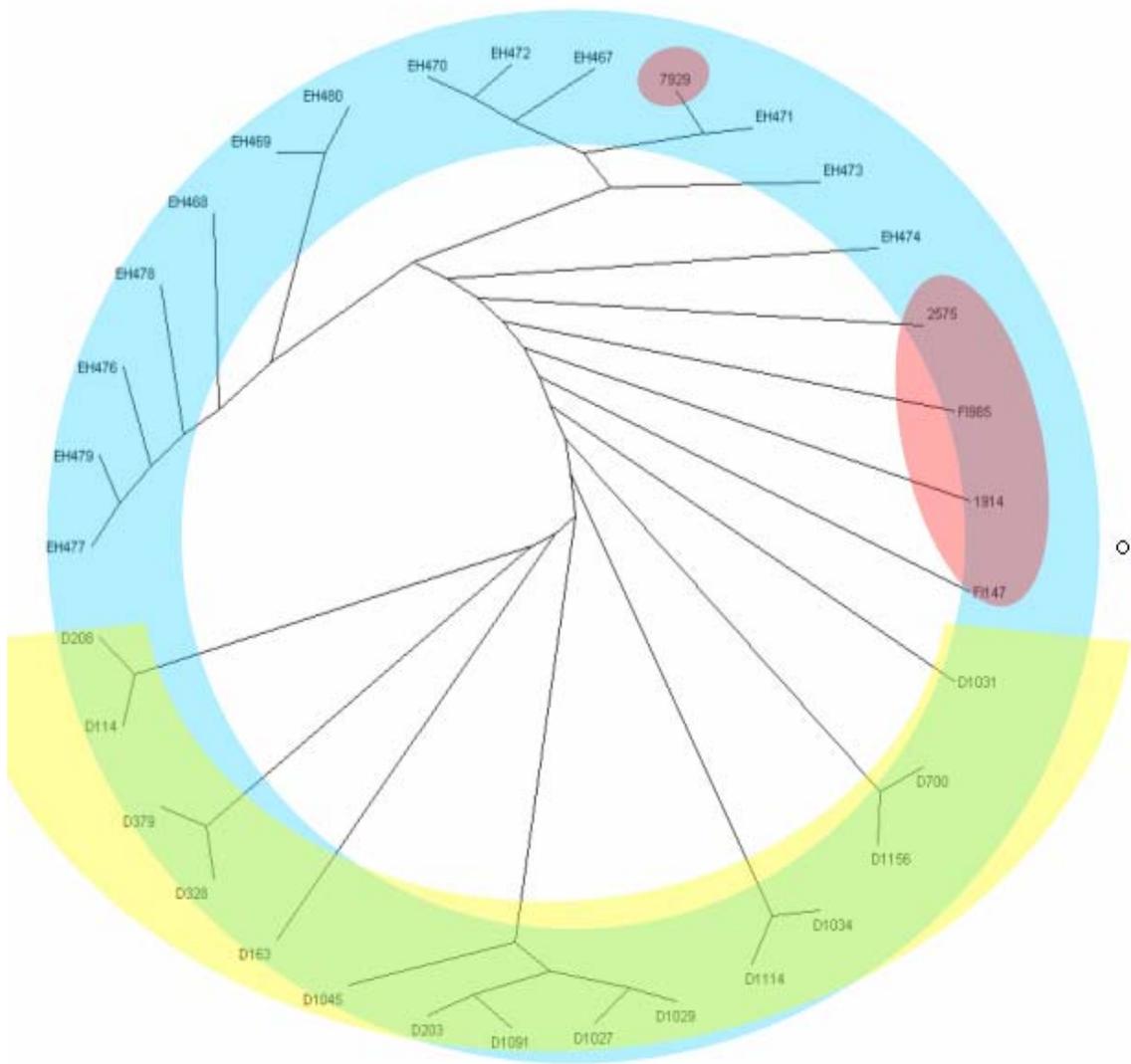
Se evaluó la especificidad de la sonda tanto con hongos entomopatógenos como con hongos patógenos de humanos. En la Fig. 22 se muestra la amplificación de la banda que corresponde a *M. anisopliae*, *M. pingshaense* y *M. robertsii*.



**Fig. 22.** Especificidad de la sonda MAMX. M = marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder; T = testigo negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V, 60 min con bromuro de etidio.

## Análisis del alineamiento las secuencias

El dendrograma mostró dos grupos, uno que engloba los aislados de *M. anisopliae* de México, junto con la cepa 7929 correspondiente a *M. pingshaense* y 2575 correspondiente a *M. robertsii*, y en el otro grupo, los aislados de *M. anisopliae* reportados por Driver *et al.* (2000) (Fig.23).



**Fig. 23.** Dendrograma utilizando las secuencias de *M. anisopliae* de México, secuencias del género *Metarhizium* reportadas por Driver *et al.* (2000) y secuencias de cinco taxones de *Metarhizium*, todas obtenidas con los oligonucleótidos TW81 y AB28. **Azul:** Aislados de *M. anisopliae* de México; **Amarillo:** Aislados de *M. anisopliae* usados por Driver *et al.*, (2000); **Rojo:** Especies diferentes a *Metarhizium anisopliae*. *M. robertsii* (2575), *M. pingshaense* (7929), *M. anisopliae* var. *acridum* (FI-985), *M. anisopliae* var. *majus* (1914), y *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (FI-147).

## DISCUSIÓN

El género *Metarhizium* ha sufrido cambios en su clasificación con el uso de diferentes técnicas, esto ha provocado que la identificación para cada uno de los hongos que comprenden el género sea más compleja. Así como muchas especies de hongos, en este género la distinción entre especies usando únicamente la morfología no es precisa, por lo cual en los últimos años la biología molecular ha sido una herramienta fundamental para el diseño de marcadores moleculares que permitan su identificación. Sin embargo, debido a que los hongos entomopatógenos parasitan un amplio espectro de hospederos de numerosas regiones geográficas, se ha observado que aislados de la misma especie presentan una gran diversidad genética (Bidochka, 2001; Butt *et al.* 2001). Por ello, es importante contar con aislados autóctonos del área donde se va a aplicar un agente microbiano como control biológico y marcadores moleculares específicos para su posterior monitoreo en el campo. En este trabajo se planteó la obtención de una sonda para identificar a *M. anisopliae*, a partir de aislados autóctonos de México.

Antes de la obtención de la sonda de DNA, los aislados de *M. anisopliae* de México, fueron sometidos a un procedimiento que permitiera garantizar su calidad y pureza, debido a que, éstos se encontraban en conservación y no presentaban las características típicas del hongo, observándose esencialmente micelio (Fig. 6), se realizó la infección de un insecto (*M. pallidipennis*) con cada uno de los aislados. Al recuperar el hongo del hemíptero, se observaron las características propias de *M. anisopliae*, posteriormente, se realizó la macro y micromorfología (tamaño de conidios) de los aislados de *M. anisopliae* (EH-473/4) de México, *M. anisopliae* (FI-1029) de Eritrea, *M. pingshaense* (ARSEF 7929) de Australia y *M. robertsii* (ARSEF 2575) estas especies fueron seleccionadas debido a que en trabajos previos (Driver *et al.* 2000; Bischoff *et al.* 2009) no se reportaron diferencias significativas en las dimensiones de los conidios de estas tres especies. Los resultados de este estudio coinciden con los autores antes mencionados al no observarse diferencias en las dimensiones de los conidios ni en el aspecto macroscópico de las colonias, mostrando una alta similitud, haciéndolas morfológicamente indistinguibles (Fig. 8). Respecto a esto, Driver *et al.* (2000) y Bischoff *et al.* (2009) mencionan que la morfología conidial es una característica útil en algunos casos al ser capaz de distinguir entre algunas especies del género, aunque el

amplio rango de similitud entre especies como en el caso de: *M. anisopliae*, *M. pingshaense*, *M. robertsii*, *M. brunneum* y *M. lepidiotae*, no permite diferenciar morfológicamente estos taxones. Además, Bischoff *et al.* (2009) atribuye estas similitudes morfológicas a un aislamiento reproductivo y a una divergencia genética más rápida en comparación con la velocidad del cambio morfológico. Los datos obtenidos con las especies estudiadas confirman que las características fenotípicas no son los mejores marcadores para diferenciar entre especies, sin embargo diversos autores continúan usando criterios morfológicos con el objetivo de combinar estos métodos con los moleculares, para lograr una identificación más precisa (Driver *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005; Bischoff *et al.*, 2009).

Una vez caracterizados los aislados fenotípicamente, se procedió a la obtención de la sonda seleccionando la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA para su diseño, debido a que ha sido ampliamente usado como una herramienta molecular en especies fúngicas para el análisis de relaciones filogenéticas de taxones con tiempos de divergencia muy antiguos, ya que las tres subunidades que lo conforman (18S, 5.8S y 28S) se encuentran altamente conservadas y los espaciadores (ITS1 e ITS2) ubicados entre las subunidades tienen elevadas tasas de sustitución (White *et al.*, 1990).

Por este motivo Driver *et al.* (2000) eligieron esta región para realizar un análisis filogenético del género *Metarhizium*. El trabajo reveló diez clados distintos entre 123 aislados estudiados. A partir de los datos generados por Driver *et al.* (2000), Entz *et al.* (2005) obtuvieron una sonda para la detección de la especie de *M. anisopliae* var. *acridum* agrupada en el clado 7 de Driver *et al.* (2000). De la misma forma en el presente trabajo se utilizaron las secuencias de *M. anisopliae* depositadas en el GenBank por Driver *et al.* (2000) correspondiente al clado 9, así como las condiciones de amplificación y oligonucleótidos del trabajo de Curran *et al.* (1994). Al realizar la amplificación de los aislados de *M. anisopliae* de México con los oligonucleótidos TW81 y AB28 se observó una baja concentración de DNA y/o bandas inespecíficas, por lo que se realizaron modificaciones en las condiciones para la PCR. Habiendo establecido las condiciones óptimas para la amplificación, se purificaron los productos de PCR para su posterior secuenciación. Para el diseño de la sonda se realizó el alineamiento con las secuencias obtenidas de cada aislado de *M. anisopliae* de México, y las secuencias depositadas en el GenBank de *M. anisopliae* reportadas por Driver *et al.* (2000), mostrando escasas regiones consenso entre ellas y de corta longitud, por lo

que el diseño de la sonda fue realizado únicamente con las secuencias de *M. anisopliae* de México. Estos resultados podrían deberse, entre otros factores, a la gran diversidad genética que existe entre los aislados de diferente origen geográfico, como fue mostrado por Navarro-Barranco (2006) al obtener diferencias en los patrones polimórficos de RAPD-PCR de los aislados de *M. anisopliae* de México con respecto a los aislados de *Metarhizium* de cepas de referencia de otras regiones geográficas. Por otro lado, Tiago *et al.* (2011), estudiaron 37 cepas de *M. anisopliae* var. *anisopliae* ( $\equiv$  *M. anisopliae*) aisladas de la mosca pinta de Brasil, con oligonucleótidos para las regiones ITS, ISSR y regiones intrónicas, y observaron una gran diversidad genética, aún entre estos aislados del mismo origen geográfico y hospedero.

La sonda diseñada (MEAN) con un tamaño molecular de 188 bp, fue sometida a una prueba *in silico* con el objetivo de comparar la región que ésta amplificaba contra todas las secuencias de nucleótidos depositadas en el Genbank, obteniendo una similitud del 100 % con *M. anisopliae*, *M. pinghaense*, y *M. robertsii*. Al realizar la prueba de especificidad en el laboratorio esta amplificó para la mayoría de los hongos correspondientes al género *Metarhizium* por lo que se consideró inespecífica y se procedió a diseñar nuevamente una sonda con base en la misma secuencia que compartían todos los aislados de México, el resultado fue la sonda (MAMX) con un tamaño molecular de 188 bp. Nuevamente, se realizó un análisis *in silico* que coincidió con los resultados de la prueba de especificidad realizada en el laboratorio con DNA obtenido de las especies de *M. pinghaense* y *M. robertsii* (Fig. 19), ya que la banda de interés amplificó tanto para los aislados de *M. anisopliae* de México como para estas especies. Al utilizar la secuencia de la región 5' del gen que codifica para el EF-1 $\alpha$ , Bischoff *et al.* (2009), mencionan que, *M. robertsii* es morfológicamente indistinguible de *M. anisopliae* y que se diferencia únicamente por cinco nucleótidos en la región del gen EF-1 $\alpha$ : 257 (gap), 258 (T), 287 (A), 447 (G) y 806 (C). Esta delimitación de especies, también se ha realizado con un hongo patógeno de humanos en el que dos especies muy cercanas, *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* se diferencian por 12 nucleótidos en la región del gen que codifica para antigen2/proline-rich antigen (antígeno2/antígeno rico en prolina) (Bialek *et al.*, 2004).

En cuanto a la similitud que presentan *M. pinghaense* y *M. anisopliae*, Huang *et al.* (2005) consideraron como sinónimos estas especies debido a su similitud en las secuencias de ITS y su morfología. Por otra parte, Schneider *et al.* (2011), al realizar un

análisis filogenético usando la región ITS obtuvieron un grupo compuesto por dos clados: MGT y PARB descritos por Bischoff *et al.* (2009). El clado MGT incluye a *M. majus* y *M. guizhouense*, mientras que el clado PARB incluye a *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, y *M. brunneum*. Estos resultados coinciden nuevamente con los obtenidos en nuestro estudio, como se muestra en el dendrograma (Fig. 23). Con base en todos estos datos, se podría sugerir que en realidad las especies fúngicas de *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. pingshaense* podrían ser consideradas como la misma especie.

En estudios futuros debería considerarse el obtener una sonda de la región que codifica para el gen del EF-1 $\alpha$ , tomando en cuenta la región del DNA que muestra las diferencias entre *M. anisopliae* y *M. robertsii* (Bischoff *et al.*, 2009).

Se han descrito diversos taxones adicionales desde la clasificación de Tulloch (1976), incluyendo *M. album*, *M. brunneum*, *M. flavoviride*, *M. pingshaense*, *M. cylindrospora*, *M. guizhouense*, *M. taii*, *M. pingshaense* y *M. biformisporae* aunque todavía no han sido formalmente reconocidos. Por otra parte, Bidochka *et al.* (2005) sugieren que el género *Metarhizium* está compuesto de un gran número de grupos genéticos y especies crípticas. Además, afirman que existe evidencia de que en climas templados algunos grupos genéticos de *Metarhizium* se adaptan a ciertas condiciones ambientales y por ello muestran un amplio rango de hospederos. En contraste, en climas tropicales y subtropicales hay evidencia de que especies de este género muestran cierta preferencia hacia algún hospedero dado, lo que puede observarse con la especie *M. acridum* que presenta un restringido número de hospederos, por ejemplo, acrídidos.

Todo lo anterior nos muestra la relevancia de la obtención de marcadores moleculares usando cepas autóctonas de la región para su diseño, ya que se ha observado una gran diversidad genética en esta especie fúngica, por lo que la utilización de sondas diseñadas a partir de cepas de otros países podrían presentar una baja eficiencia con aislados de México.

## CONCLUSIONES

- Este trabajo es el primero en realizar el diseño de una sonda de DNA específica y sensible para *M. anisopliae* usando aislados autóctonos del país.
- La sonda MEAN fue inespecífica al amplificar para diversos hongos.
- La sonda MAMX fue altamente sensible al detectar hasta 500 fg/ $\mu$ L, en cuanto a la especificidad, logró la identificación de *M. anisopliae*, *M. pingshaense* y *M. robertsii*, sugiriendo que podrían pertenecer a la misma especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF, Madden TL, Shaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lippman TJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Arroyo E. 2005. Obtención de marcadores de regiones Amplificadas de Secuencias Caracterizadas, para la identificación del hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Tesis de Licenciatura, UNAM. México.
- Arroyo E. 2007. Obtención de marcadores SCARs a partir de patrones AFLP para la identificación del hongo *Paecilomyces fumosoroseus*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM. México.
- Arroyo-Vásquez E, Toriello C, Reyes-Montes MR. 2007. Obtención de marcadores moleculares para la identificación de *Paecilomyces fumosoroseus*. En: Memorias del XXX Congreso Nacional de Control Biológico. Simposio del Organismo Internacional de Control Biológico. Memorias de la Sociedad Mexicana de Control Biológico. Mérida, México. Noviembre 11-15. pp 363-366.
- Ayala- Zermeño MA, Reyes- Montes MR, Arroyo- Vázquez E, Calderón- Ezquerro MC, Mier T, Robledo- Retana T, Toriello C. 2011. An *Isaria fumosorosea* SCAR marker for evaluation of soil, insect and airborne samples. *Biocontrol Science and Technology* 21(9): 1091- 1102.
- Badii MH, Flores AE, Galán LJ. 2000. Fundamentos y Perspectivas del Control Biológico. UANL, Monterrey.
- Badii MH, Guajardo R. 2009. Manejo holístico de las plagas (MHP) y desarrollo sustentable. En: Badii MH, Castillo J (eds). *Desarrollo sustentable: Métodos, aplicaciones y perspectivas*. UANL, Monterrey, pp. 407- 422.
- Barron GL. 1983. *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida, EUA.
- Basilio-Hernández D, Montoya-Sansón E, Navarro-Barranco H, Hernández-Velázquez V, Berlanga-Padilla A, Toriello C. 2007. Comparación de producción de conidios de diversos aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en sustrato sólido. En: Memorias del XXX Congreso Nacional de Control Biológico. Simposio del Organismo Internacional de Control Biológico. Memorias de la Sociedad Mexicana de Control Biológico. Mérida, México. Noviembre 11-15. pp. 340-344.
- Berlanga PAM, Hernández VVM, Garza E. 1997. *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sor. Para el control microbiano de mosca pinta *Aeneolamia* spp. En: Memorias del XX Congreso Nacional de Control Biológico. Guadalajara, México. Noviembre 10. pp. 51-54.
- Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Ceceñas L, Reischl U, Gonzalez MG. 2004. PCR Assay for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. *Journal of Clinical Microbiology* 42(2): 778-783.
- Bidartondo MI, Gardes M. 2005. Fungal Diversity in Molecular Terms: Profiling, Identification, and Quantification in the Environment. En: Dighton J, White JF, Odemans P (eds). *The Fungal Community, its organization and role in the ecosystem*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, EUA, pp. 215-239.
- Bidochka MJ. 2001. Monitoring the Fate of Biocontrol Fungi. En: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds). *Fungi as biocontrol Agents, Progress, Problems and Potencial*. CAB International, New York, EUA, pp. 193-213.

- Bidochka MJ, Small CLN, Spironello M. 2005. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Environmental Microbiology* 7: 1361-1368.
- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycology* 101(4): 512-530.
- Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001: Introduction- Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. En: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds). *Fungi as biocontrol Agents, Progress, Problems and Potencial*. CAB International, New York, EUA, pp. 1-8.
- Calderón C, Ward E, Freeman J, McCartney A. 2002. Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Aerosol Science* 33: 283–296.
- Calderón-Ezquerro C, Santiago-López I, Guerrero-Guerra C, Reyes-Montes MR, Calderón-Segura ME, Toriello C. 2012. Molecular detection of the airborne entomopathogen fungus *Metarhizium acridum* using specific oligonucleotides. *Aerobiología* 28: 233-239.
- Castrillo LA, Vanderberg JD, Wraight SP. 2002. Strain- specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence- characterized amplified region markers. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 75- 83.
- Curran J, Driver F, Ballard JWO, Milner RJ. 1994. Phylogeny of *Metarhizium*: sequence analysis of the internally transcribed and 5.8 S region of the ribosomal DNA repeat. *Mycological Research* 9: 547-552.
- Charnley AK, St. Leger RJ. 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. En: Cole TG, Hoch CH (Eds.). *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press, New York, EUA, pp. 267-286.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TL. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London.
- Driver F, Milner RJ, Trueman JWH. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104:134-150.
- Entz S, Jonson D, Kawchuk L. 2005. Development of PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycological Research* 109: 1302-1312.
- Flores S. 1994. *Las plagas de caña de azúcar en México*. Taller Servicios Gráficos, Córdoba, VZ, México.
- Goettel MS, Eilenberg J, Glare TR. 2005. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. En: Gilbert, Iatrou K, Gill S (Eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science* Vol. 6. Elsevier Pergamon, Oxford, UK. pp.361-406.
- Greathead DJ, Waage JK. 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. *The World Bank Technical Paper* Number 11.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. International Mycological Institute, Cab International, Cambridge.
- Huang B, Li C, Humber RA, Hodge KT, Fan M, Li Z. 2005. Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Mycotaxon* 94:137-147.
- Huffaker CB, Dahlsten DL. 1999. Scope and significance of Biological Control. En: Bellows TS, Fisher TW, (Eds.) *Handbook of Biological Control*. Academic Press, London, UK, pp. 1-15.

- Leal Guerra JF, Reyes Hernández J, Guillen Vázquez A. 1998. Manejo integrado de plagas de la caña de azúcar en los ingenios del grupo Sáenz Tamaulipas, México. En: Memorias del XXI Congreso Nacional de Control Biológico. Tamaulipas, México. Noviembre 5-6. pp. 286-287.
- Lee SB, Taylor JW. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.). PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, EIA, pp. 282-287.
- Lenteren JV van. 2008. IOBC Internet Book of Biological Control, version 5.
- Meyling NV, Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43:145-155.
- Montoya-Sansón E, Berlanga-Padilla A, Hernández-Velázquez VM, Toriello C. 2006. Evaluación de la viabilidad de conidios de *Metarhizium anisopliae* en formulaciones líquidas en almacenamiento. En Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, México. Noviembre 5-10. pp. 545-549.
- Montoya-Sansón E, Zavala-Ramírez M, Mier T, Hernández-Velázquez V, Berlanga-Padilla A, Toriello C. 2007. Virulencia de diversos aislados de *Metarhizium anisopliae* en el modelo experimental de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). En Memorias del XXX Congreso Nacional de Control Biológico. Simposio del Organismo Internacional de Control Biológico. Memorias de la Sociedad Mexicana de Control Biológico. Mérida, México. Noviembre 11-15. pp. 105-108.
- Morales VI, de la Torre RR. 1992. Alternativas para el control de mosca pinta o salivazo de los pastos *Aeneolamia albofasciata* en caña de azúcar, en la zona del Mante, Tamaulipas. En: Memorias del XV Congreso Nacional de Control Biológico. Cuatitlán Izcalli, Edo. de México. Octubre pp. 79- 81.
- Navarro-Barranco H, Reyes-Montes MR, Berlanga-Padilla A, Toriello C. 2006. Tipificación genotípica del hongo *Metarhizium anisopliae* aislado de la mosca pinta de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en México. En: Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima. Noviembre 5-10, 2006. pp. 541-544.
- Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO). 2009. En: <http://www.wpro.who.int/hse/pages/agriculturallist.html>. (Consultado el 24 de Marzo de 2009).
- Ortega CA. 1987. Insectos nocivos de maíz: una guía para su identificación en campo. CIMYYT. pp. 41.
- Reyes-Montes MR, Cano-Ramírez C, Arroyo-Vázquez E, Hernández-Ramírez A, Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Navarro-Barranco H, Hernández-Velázquez VM, Toriello C. 2012. Molecular typing by AFLP and RAPD-PCR analysis and development of sequence-characterized amplified regions (SCARS) of *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum* isolated from locusts (Orthoptera: Acrididae). Submitted.
- Ridell R. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycology* 42:265-270.
- Rodríguez LDA. 2004. Fitoprotección de la Caña de Azúcar: Plagas. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Rombach MC, Humber RA, Roberts DW. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., A pathogen of plant leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Island. *Mycotaxon* 27: 87-92.
- Rombach MC, Humbert RA, Evans HC. 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers. *Transactions of the British Mycology Society* 88: 451-459.

- Secretaría de Agricultura (SAGAR), Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), Centro nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB). 1999. Control microbiano de la mosca pinta *Aeneolamia* spp. con *Metarhizium anisopliae*. Ficha técnica CB-08.
- Samson RA, Evans HC, Latgé JP. 1998. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, The Netherlands.
- Schena L, Finetti SM, Gallitelli D. 2002. Molecular Detection of Strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease* 86:54-60.
- Schneider S, Rehner SA, Widmer F y Enkerli J. 2011. A PCR- based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade I. *Journal of Invertebrate Pathology* 108 (2): 106- 114.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2009. En: <http://www.azucar.gob.mx/index.php?portal=cania>. (Consultado el 25 marzo de 2009)
- Siegel JP. 1997. Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. En: Lacey L (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, Londres, UK, pp. 325- 336.
- St. Leger RJ y Roberts DW. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends in Biotechnology* 15: 83- 87.
- Thomas MB, Read AF. 2007. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews in Microbiology* 5:377- 383.
- Thompson V, León GR. 2005. La identificación y distribución de los salivazos de la caña de azúcar y los pastos (Homoptera: Cercopidae) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. Costa Rica. 75: 43-51.
- Toriello C, Pérez-Torres A, Burciaga-Díaz A. 2006. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65:278-287.
- Tulloch M. 1976. The genus *Metarhizium*. *The Mycological Society* 66: 407-411.
- Umul MX. 2000. Evaluación de tres dosis y seis épocas de aplicación de ethrel, utilizado como inhibidor en la floración de caña de azúcar (*Saccharum* sp) en el estrato alto del ingenio El Baúl, S.A., Escuintla, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Unruh TR, Wooley JB. 1999. Molecular methods in classical biological control. En: Bellows TS, Fisher TW, (Eds.) *Handbook of Biological Control*. Academic Press, London, UK, pp. 57-76.
- Watanabe T. 1994. Pictorial Atlas of Soil and Seed fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. Lewis Publishers, Tokyo, Japón, pp.411.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications* 38: 315-322.
- World Health Organization (WHO), 2009. En: ([http://search.who.int/search?q=categoria+de+toxicidad&ie=utf8&site=default\\_collection&client=\\_es&proxystylesheet=\\_es&output=xml\\_no\\_dtd&oe=utf8](http://search.who.int/search?q=categoria+de+toxicidad&ie=utf8&site=default_collection&client=_es&proxystylesheet=_es&output=xml_no_dtd&oe=utf8)).
- Williams RH, Ward E, McCartney HA. 2001. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for the detection of airborne fungal spores. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2453-2459.
- Zavala Ramírez M. 2005. Evaluación de la virulencia de 16 aislados del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Tesis licenciatura en Biología, UAM-Xochimilco.

Zimmerman G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 2007: 17(9): 879-920.

## ANEXOS

### Anexo 1: Lista de oligonucleótidos con una región de (422 bp) para sonda MEAN

Selection parameters:

Product length: 200-500

Primer length: 20-22, Tm: 55°C-63°C, GC: 50 %-60 %

Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
62 GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT Len=20 Tm= 62.7°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
82 TACTACTGCGCAGAGGAGGG Len=20 Tm= 60.6°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
122 AATTTAAGGGACGGCTGTGC Len=20 Tm= 61.4°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
123 ATTTAAGGGACGGCTGTGCT Len=20 Tm= 61.0°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
196 CGTAATGACGCTCGAACAGG Len=20 Tm= 61.8°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
197 GTAATGACGCTCGAACAGGC Len=20 Tm= 60.8°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
198 TAATGACGCTCGAACAGGCA Len=20 Tm= 62.8°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
217 ATGCCCGCCAGAATACTGAC Len=20 Tm= 62.3°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
226 AGAATACTGACGGGCGCAAT Len=20 Tm= 61.9°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
228 AATACTGACGGGCGCAATGT Len=20 Tm= 62.7°C	503 CGGAGGGATCATTACCGAGT Len=20 Tm= 61.2°C
80 TTTACTACTGCGCAGAGGAG Len=20 Tm= 56.0°C	502 GGAGGGATCATTACCGAGTT Len=20 Tm= 57.9°C
81 TTACTACTGCGCAGAGGAGG Len=20 Tm= 58.3°C	502 GGAGGGATCATTACCGAGTT Len=20 Tm= 57.9°C
62 GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT Len=20 Tm= 62.7°C	416 GGGACCCGAACCTTCTGAAT Len=20 Tm= 62.5°C
82 TACTACTGCGCAGAGGAGGG Len=20 Tm= 60.6°C	416 GGGACCCGAACCTTCTGAAT Len=20 Tm= 62.5°C
122 AATTTAAGGGACGGCTGTGC Len=20 Tm= 61.4°C	416 GGGACCCGAACCTTCTGAAT Len=20 Tm= 62.5°C
123 ATTTAAGGGACGGCTGTGCT Len=20 Tm= 61.0°C	416 GGGACCCGAACCTTCTGAAT Len=20 Tm= 62.5°C

Len=20 Tm= 61.0°C	Len=20 Tm= 62.5°C
196 CGTAATGACGCTCGAACAGG	416 GGGACCCGAACCTTCTGAAT
Len=20 Tm= 61.8°C	Len=20 Tm= 62.5°C
197 GTAATGACGCTCGAACAGGC	416 GGGACCCGAACCTTCTGAAT
Len=20 Tm= 60.8°C	Len=20 Tm= 62.5°C
198 TAATGACGCTCGAACAGGCA	416 GGGACCCGAACCTTCTGAAT
Len=20 Tm= 62.8°C	Len=20 Tm= 62.5°C
81 TTACTACTGCGCAGAGGAGG	345 CAACGGATCTCTTGGTTCTG
Len=20 Tm= 58.3°C	Len=20 Tm= 58.3°C
81 TTACTACTGCGCAGAGGAGG	341 GGATCTCTTGGTTCTGGCAT
Len=20 Tm= 58.3°C	Len=20 Tm= 59.1°C
82 TACTACTGCGCAGAGGAGGG	341 GGATCTCTTGGTTCTGGCAT
Len=20 Tm= 60.6°C	Len=20 Tm= 59.1°C
123 ATTTAAGGGACGGCTGTGCT	341 GGATCTCTTGGTTCTGGCAT
Len=20 Tm= 61.0°C	Len=20 Tm= 59.1°C
80 TTTACTACTGCGCAGAGGAG	340 GATCTCTTGGTTCTGGCATC
Len=20 Tm= 56.0°C	Len=20 Tm= 57.2°C
81 TTACTACTGCGCAGAGGAGG	340 GATCTCTTGGTTCTGGCATC
Len=20 Tm= 58.3°C	Len=20 Tm= 57.2°C
81 TTACTACTGCGCAGAGGAGG	339 ATCTCTTGGTTCTGGCATCG
Len=20 Tm= 58.3°C	Len=20 Tm= 60.2°C
82 TACTACTGCGCAGAGGAGGG	339 ATCTCTTGGTTCTGGCATCG
Len=20 Tm= 60.6°C	Len=20 Tm= 60.2°C
122 AATTTAAGGGACGGCTGTGC	339 ATCTCTTGGTTCTGGCATCG
Len=20 Tm= 61.4°C	Len=20 Tm= 60.2°C
123 ATTTAAGGGACGGCTGTGCT	339 ATCTCTTGGTTCTGGCATCG
Len=20 Tm= 61.0°C	Len=20 Tm= 60.2°C
62 GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT	335 CTTGGTTCTGGCATCGATGA
Len=20 Tm= 62.7°C	Len=20 Tm= 62.2°C
82 TACTACTGCGCAGAGGAGGG	335 CTTGGTTCTGGCATCGATGA
Len=20 Tm= 60.6°C	Len=20 Tm= 62.2°C
122 AATTTAAGGGACGGCTGTGC	335 CTTGGTTCTGGCATCGATGA
Len=20 Tm= 61.4°C	Len=20 Tm= 62.2°C
123 ATTTAAGGGACGGCTGTGCT	335 CTTGGTTCTGGCATCGATGA
Len=20 Tm= 61.0°C	Len=20 Tm= 62.2°C
62 GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT	333 TGGTTCTGGCATCGATGAAG
Len=20 Tm= 62.7°C	Len=20 Tm= 62.2°C
82 TACTACTGCGCAGAGGAGGG	333 TGGTTCTGGCATCGATGAAG
Len=20 Tm= 60.6°C	Len=20 Tm= 62.2°C
122 AATTTAAGGGACGGCTGTGC	333 TGGTTCTGGCATCGATGAAG

Len=20 Tm= 61.4°C	Len=20 Tm= 62.2°C
123 ATTTAAGGGACGGCTGTGCT	333 TGGTTCTGGCATCGATGAAG
Len=20 Tm= 61.0°C	Len=20 Tm= 62.2°C
62 GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT	332 GGTTCTGGCATCGATGAAGA
Len=20 Tm= 62.7°C	Len=20 Tm= 61.2°C
82 TACTACTGCGCAGAGGAGGG	332 GGTTCTGGCATCGATGAAGA
Len=20 Tm= 60.6°C	Len=20 Tm= 61.2°C
122 AATTTAAGGGACGGCTGTGC	332 GGTTCTGGCATCGATGAAGA
Len=20 Tm= 61.4°C	Len=20 Tm= 61.2°C
123 ATTTAAGGGACGGCTGTGCT	332 GGTTCTGGCATCGATGAAGA
Len=20 Tm= 61.0°C	Len=20 Tm= 61.2°C
62 GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT	329 TCTGGCATCGATGAAGAACG
Len=20 Tm= 62.7°C	Len=20 Tm= 62.3°C
82 TACTACTGCGCAGAGGAGGG	329 TCTGGCATCGATGAAGAACG
Len=20 Tm= 60.6°C	Len=20 Tm= 62.3°C
122 AATTTAAGGGACGGCTGTGC	329 TCTGGCATCGATGAAGAACG
Len=20 Tm= 61.4°C	Len=20 Tm= 62.3°C
123 ATTTAAGGGACGGCTGTGCT	329 TCTGGCATCGATGAAGAACG
Len=20 Tm= 61.0°C	Len=20 Tm= 62.3°C

Anexo 2: Lista de secuencias emitidas por BLAST que producen un alineamiento significativo con la secuencia flanqueada por oligonucleótidos MEAN

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<b>Genomic sequences</b>						
<a href="#">HQ722915.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CENIEN041 18S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">HM055430.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 2105 small subunit ribosomal RN	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">HM055429.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 1080 small subunit ribosomal RN	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">HM055427.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 794 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">HM055425.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 549 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ609304.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 549 18S ribosomal RNA gene, pa	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EU307903.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 202 18S ribosomal R	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EU307902.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 189 18S ribosomal R	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051729.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG491 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051728.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG423 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051724.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG291 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051723.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG144 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051722.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG125 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051721.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG97 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051720.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG87 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051719.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG47 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051718.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG46 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051717.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG33 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051716.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG31 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051715.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG30 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051708.1</a>	Metarhizium anisopliae strain NORDESTE 18S ribosomal RNA gene, pa	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051707.1</a>	Metarhizium anisopliae strain RJd 18S ribosomal RNA gene, partial sec	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051706.1</a>	Metarhizium anisopliae strain E9 18S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051705.1</a>	Metarhizium anisopliae strain E6 18S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051704.1</a>	Metarhizium anisopliae strain MT 18S ribosomal RNA gene, partial sec	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051703.1</a>	Metarhizium anisopliae strain M5 18S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">EF051702.1</a>	Metarhizium anisopliae strain AL 18S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">AF137055.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain FI-23 18S ribosomal RNA	<a href="#">780</a>	780	100%	0.0	100%
<a href="#">AY387579.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain 299982 18S ribosomal R	<a href="#">774</a>	774	99%	0.0	100%
<a href="#">JN379352.1</a>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">HQ331464.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 7450 18S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">HQ331461.1</a>	Metarhizium sp. DOK 261 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%

<a href="#">JN256673.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate Ma129 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">JF495772.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate 090919-16-1 18S ribosomal RNA gene,	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">JF495768.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate 100513-4-1 18S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">JF792884.1</a>	Metarhizium anisopliae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">HM770971.1</a>	Metarhizium sp. INBio2855L internal transcribed spacer 1, partial seq	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ589647.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ6 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ589646.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ5 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ589645.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ4 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ589644.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545326.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate SKCJ1 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545325.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545323.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate NLHN3 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545321.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate NLAN 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545319.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate LSVT2 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545294.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNHE 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545290.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNGX 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545281.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNGD6 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ545278.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNGD3 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">HM192932.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate TW-mdais02 18S ribosomal RNA gene,	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">HM055443.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 2575 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">HM055442.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 2134 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">HM055441.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 967 small subunit ribosomal RNA q	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">HM055440.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 23 small subunit ribosomal RNA qe	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">GU909512.1</a>	Metarhizium anisopliae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177505.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177504.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-37 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177502.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-3 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177501.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-4 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177499.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-39 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177497.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-15 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177490.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-10 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177489.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-14 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177485.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-26 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177483.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-40 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177482.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-34 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177481.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-31 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177477.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-58 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ177473.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-49 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ888737.1</a>	Metarhizium anisopliae strain HZ1 18S ribosomal RNA, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
.....		---	---	.....	--	----

<a href="#">F1177477.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-58 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">F1177473.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-49 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ888737.1</a>	Metarhizium anisopliae strain HZ1 18S ribosomal RNA, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">F1609311.1</a>	Metarhizium anisopliae strain M34412 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">F1609307.1</a>	Metarhizium anisopliae strain HKB11v 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">F1609306.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 3540 18S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530678.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530677.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530676.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530675.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530674.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530673.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530672.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530671.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530670.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530669.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU530668.1</a>	Metarhizium anisopliae internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU307926.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae isolate Q2 18S ribosomal RNA c	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU307906.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 207 18S ribosomal R	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU307904.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 205 18S ribosomal R	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU307893.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 148 18S ribosomal R	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EU307885.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 212 18S ribosomal R	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EF113341.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain Mb7 18S ribosomal RNA	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EF051726.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG343 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EF051712.1</a>	Metarhizium anisopliae strain C14 18S ribosomal RNA gene, partial se	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">EF051710.1</a>	Metarhizium anisopliae strain C11 18S ribosomal RNA gene, partial se	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">DQ650708.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain Dz01 18S ribosomal RNA	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">DQ421049.1</a>	Uncultured soil fungus clone 30-1 18S ribosomal RNA gene, partial se	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">DQ421048.1</a>	Uncultured soil fungus clone 174-75 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%
<a href="#">DQ421047.1</a>	Uncultured soil fungus clone 174-70 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">769</a>	769	100%	0.0	99%

**Anexo 3: Secuencia consenso, lista de oligonucleótidos y lista de secuencias similares para oligonucleótidos MAMX (188 bp)**

Secuencia consenso obtenida del alineamiento de los aislados de *M. anisopliae* de México

AAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCCTGTTGCGAGT  
 GTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAAG  
 GGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACA  
 GGGGACTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATAC  
 TGACGGGCGCAATGTGC

Lista de oligonucleótidos emitidos por el programa DNAMAN1

Selection parameters:

Product length: 150-188

Primer length: 20-22, Tm: 62°C-65°C, GC: 50%-60%

Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
2 GGCTCCTGTTGCGAGTGTT Len=20 Tm= 62.7°C	187 ACATTGCGCCCGTCAGTATT Len=20 Tm= 62.7°C
20 TTTACTACTGCGCAGAGGAGGG Len=22 Tm= 62.9°C	187 ACATTGCGCCCGTCAGTATT Len=20 Tm= 62.7°C
1 GGGCTCCTGTTGCGAGTGTT Len=20 Tm= 64.9°C	186 CATTGCGCCCGTCAGTATTC Len=20 Tm= 63.8°C
2 GGCTCCTGTTGCGAGTGTT Len=20 Tm= 62.7°C	186 CATTGCGCCCGTCAGTATTC Len=20 Tm= 63.8°C
20 TTTACTACTGCGCAGAGGAGGG Len=22 Tm= 62.9°C	186 CATTGCGCCCGTCAGTATTC Len=20 Tm= 63.8°C
1 GGGCTCCTGTTGCGAGTGTT Len=20 Tm= 64.9°C	184 TTGCGCCCGTCAGTATTCTG Len=20 Tm= 64.5°C
2 GGCTCCTGTTGCGAGTGTT Len=20 Tm= 62.7°C	184 TTGCGCCCGTCAGTATTCTG Len=20 Tm= 64.5°C
20 TTTACTACTGCGCAGAGGAGGG Len=22 Tm= 62.9°C	184 TTGCGCCCGTCAGTATTCTG Len=20 Tm= 64.5°C
2 GGCTCCTGTTGCGAGTGTT Len=20 Tm= 62.7°C	176 GTCAGTATTCTGGCGGGCAT Len=20 Tm= 62.3°C
20 TTTACTACTGCGCAGAGGAGGG Len=22 Tm= 62.9°C	176 GTCAGTATTCTGGCGGGCAT Len=20 Tm= 62.3°C
1 GGGCTCCTGTTGCGAGTGTT Len=20 Tm= 64.9°C	159 CATGCCTGTTTCGAGCGTCAT Len=20 Tm= 62.3°C

	Len=20 Tm= 64.9°C		Len=20 Tm= 64.6°C
2	GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT	159	CATGCCTGTTCGAGCGTCAT
	Len=20 Tm= 62.7°C		Len=20 Tm= 64.6°C
1	GGGCTCCTGTTGCGAGTGTT	158	ATGCCTGTTCGAGCGTCATT
	Len=20 Tm= 64.9°C		Len=20 Tm= 63.1°C
2	GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT	158	ATGCCTGTTCGAGCGTCATT
	Len=20 Tm= 62.7°C		Len=20 Tm= 63.1°C
2	GGCTCCTGTTGCGAGTGTTT	157	TGCCTGTTCGAGCGTCATTA
	Len=20 Tm= 62.7°C		Len=20 Tm= 62.8°C

Anexo 4. Lista de secuencias emitidas por el BLAST que producen un alineamiento significativo con la secuencia flanqueada por oligonucleótidos MAMX

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<b>Genomic sequences</b>						
<a href="#">JN379352.1</a>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">GU187830.1</a>	Uncultured fungus clone RFLP9 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ331461.1</a>	Metarhizium sp. DOK 261 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ331454.1</a>	Metarhizium pingshaense strain ARSEF 4342 18S ribosomal RNA gene	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ331453.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 727 18S ribosomal RNA gene, part	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">JN618373.1</a>	Metarhizium anisopliae voucher AMAAS24 internal transcribed spacer	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">JN618366.1</a>	Metarhizium anisopliae voucher AMAAS17 internal transcribed spacer	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">JN256668.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate MGC06 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">JN256667.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate GC02 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">JF495779.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate 100513-11-2 18S ribosomal RNA gene,	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">JF495768.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate 100513-4-1 18S ribosomal RNA gene, t	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">JF495767.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate 100513-11-1 18S ribosomal RNA gene,	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ905471.1</a>	Metarhizium robertsii isolate 15 internal transcribed spacer 1, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">JF792884.1</a>	Metarhizium anisopliae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inl	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ539658.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate Amiss2009 5.8S ribosomal RNA gene ar	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ722915.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CENIEN041 18S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ179979.1</a>	Metarhizium pingshaense strain SK04 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ380859.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ART2531 internal transcribed spacer 1,	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HQ380855.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ART36 internal transcribed spacer 1, pa	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ589648.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ589647.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ6 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ589646.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ5 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ589645.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ4 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ589644.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%

<a href="#">FJ589646.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ5 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ589645.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ4 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ589644.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545326.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate SKCJ1 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545325.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545324.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate NLUT 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545323.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate NLHN3 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545322.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate NLHN2 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545321.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate NLAN 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545314.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate LSPK 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545312.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate LSNM2 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545311.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate LSNM1 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545295.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNHN1 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545282.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNGD7 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545279.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNGD4 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545277.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate CNGD2 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055447.1</a>	Metarhizium pingshaense strain ARSEF 2162 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055443.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 2575 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055442.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 2134 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055441.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 967 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055440.1</a>	Metarhizium robertsii strain ARSEF 23 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055430.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 2105 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055429.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 1080 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055427.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 794 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">HM055425.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 549 small subunit ribosomal RNA	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">AB524427.1</a>	Metarhizium anisopliae gene for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">AB524426.1</a>	Metarhizium anisopliae gene for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">AB524425.1</a>	Metarhizium anisopliae gene for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">AB524424.1</a>	Metarhizium anisopliae gene for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%

<a href="#">FJ177502.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-3 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177501.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-4 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177499.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-39 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177497.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-15 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177496.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-20 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177490.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-10 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177489.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-14 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177485.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-26 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177483.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-40 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177482.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-34 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177481.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-31 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177479.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-32 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177477.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-58 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ177473.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-49 18S ribosomal RNA gene, parti.	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ617340.1</a>	Metarhizium cf. anisopliae DWR 356 internal transcribed spacer 1, pa	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ617321.1</a>	Metarhizium robertsii isolate ARSEF 2575 internal transcribed spacer	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ617317.1</a>	Metarhizium robertsii isolate ARSEF 727 internal transcribed spacer 1	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ617316.1</a>	Metarhizium robertsii isolate ARSEF 23 internal transcribed spacer 1,	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ617315.1</a>	Metarhizium cf. anisopliae DWR 346 internal transcribed spacer 1, pa	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ617314.1</a>	Metarhizium cf. anisopliae DWR 338 internal transcribed spacer 1, pa	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ617309.1</a>	Metarhizium cf. anisopliae ARSEF 728 internal transcribed spacer 1, ;	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ375161.1</a>	Ascomycota sp. H-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ609307.1</a>	Metarhizium anisopliae strain HKB11v 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ609306.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 3540 18S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ609304.1</a>	Metarhizium anisopliae strain ARSEF 549 18S ribosomal RNA gene, pa	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EU307926.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae isolate Q2 18S ribosomal RNA c	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EU307909.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 211 18S ribosomal R	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EU307906.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 207 18S ribosomal R	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EU307904.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 205 18S ribosomal R	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EU307903.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 202 18S ribosomal R	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%

<a href="#">EU307902.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 189 18S ribosomal R	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EU307886.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 42 18S ribosomal RN	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EU307885.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain LRC 212 18S ribosomal R	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051729.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG491 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051728.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG423 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051726.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG343 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051724.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG291 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051723.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG144 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051722.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG125 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051721.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG97 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051720.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG87 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051719.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG47 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051718.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG46 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051717.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG33 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051716.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG31 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051715.1</a>	Metarhizium anisopliae strain CG30 18S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">EF051710.1</a>	Metarhizium anisopliae strain C11 18S ribosomal RNA gene, partial se	<a href="#">348</a>	348	100%	9e-93	100%
<a href="#">FJ545310.1</a>	Metarhizium anisopliae isolate LSNA2 18S ribosomal RNA gene, partia	<a href="#">344</a>	344	100%	1e-91	99%

