



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE AISLADOS DE MÉXICO DEL COMPLEJO *Metarhizium*
anisopliae

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BRUNNER MENDOZA CAROLINA ANGÉLICA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL ROCÍO ALICIA REYES MONTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

TUTOR INVITADO: DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

CD. MX., NOVIEMBRE, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de marzo de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **BRUNNER MENDOZA CAROLINA ANGÉLICA** con número de cuenta **510020819**, con la tesis titulada "**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE AISLADOS DE MÉXICO DEL COMPLEJO *Metarhizium anisopliae***", realizada bajo la dirección de la **DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA**:

Presidente: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Vocal: DRA. MARGARITA CABRERA BRAVO
Secretario: DRA. MARÍA DEL ROCÍO ALICIA REYES MONTES
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
Suplente: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de octubre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACyT por la beca doctoral otorgada CVU 346729.

A mi tutor principal la **Dra. Conchita Toriello.**

“Un líder es alguien con la visión y la convicción de que un sueño puede conseguirse y además, inspira la fuerza y la energía para conseguirlo.”

Por el apoyo que me ha brindado en toda mi formación académica, por sus enseñanzas como profesor y sabiduría como persona.

A los miembros del comité

“Los grandes logros de cualquier persona generalmente dependen de muchas manos, corazones y mentes.”

Por todo su apoyo, consejos, enseñanzas y tiempo.

Dra. Rocío Reyes-Montes

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Dr. Daniel Piñero Dalmau

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Tere Mier

“Un líder es aquel que conoce el camino, anda en el camino y muestra el camino.”

Con mucha admiración y cariño y por ser la precursora de éste sueño.

Tuve la fortuna de encontrar en mi camino personas maravillosas, que me abrieron las puertas desde el principio, sin conocerme y sin condiciones, que enriquecieron mi vida, fueron parte de mi formación no solo académica sino como ser humano y que siempre tendrán un lugar en mi corazón. Estaré eternamente agradecida y bendecida por su compañía y amistad.

Dr. Michael J. Bidochka

Dr. David S. Gernandt

M. en C. Hortencia Navarro Barranco

Dra. Soumya Moonjely

Médico pasante Laura Parra Jaramillo

Dra. Esperanza Duarte Escalante

Dra. Guadalupe Frías de León

M. en C. Eugenia Flores Robles

Muy especialmente a la familia Bidochka y con mucho cariño a Mary Bidochka

“Всесвіт з її численними просторами і часами... і мені було приємно збігатися з тобою і усвідомлювати, що серця визнають один одного незалежно від дистанції, віку або походження”

A mi Dhana y a mi Inmortal amor

“Ten paciencia, constancia y valor
para poder ver lo invisible, para
creer lo increíble y lograr lo
imposible.”

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	11
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
ANTECEDENTES	14
<i>Metarhizium</i> , clasificación y filogenia	15
Morfología	18
Diversidad genética	19
Asociación con raíces de plantas	21
Éxito evolutivo y diversificación en los mecanismos de infección	23
Metabolitos secundarios	27
Comportamiento en el ambiente	29
Interacciones con hospederos	30
<i>Metarhizium</i> como agente de control biológico en México	32
METODOLOGÍA	37
Aislados	38
Obtención de aislados monospóricos	41
Caracterización fenotípica	43
Macromorfología	43
Micromorfología	45
Termotolerancia	46
Bioensayos	47
Asociación con raíces de plantas	48
Extracción de ADN	50
Cuantificación de ADN	51
Genotipificación por RAPD-PCR	51
Amplificación por PCR	52
Subtilisina Pr1	52
Espaciador Interno Transcrito ITS1 e ITS2	54
Factor de Elongación TEF	56
Regiones Intergénicas IGS	57
Análisis de polimorfismos por RFLP	58
Análisis de los datos moleculares	59

RESULTADOS	60
Aislados y obtención de monospóricos	61
Caracterización fenotípica	62
Macromorfología	62
Crecimiento radial	64
Micromorfología	65
Termotolerancia	66
Bioensayos	67
Asociación con raíces de plantas	69
Cuantificación de ADN	69
Genotipificación por RAPD-PCR	70
Amplificación y secuenciación	73
Análisis de polimorfismos	74
Análisis de los datos moleculares	75
DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES	94
LITERATURA CITADA	96
ANEXOS	107
Anexo 1 Composición de medio APD	108
Anexo 2 Composición de lactofenol azul de algodón	108
Anexo 3 Preparación de TBE	108
Anexo 4 Características morfológicas de <i>Metarhizium</i>	109
Anexo 5 Tasa de crecimiento de aislados de <i>Metarhizium</i> de México	110
Anexo 6 Tabla de aislados de <i>Metarhizium</i> de México	111
Anexo 7 Artículo requisito	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Clasificaciones del género <i>Metarhizium</i> .	17
Figura 2	Morfología del conidióforo, fiálides, conidios y columnas de conidios de <i>M. anisopliae</i> .	18
Figura 3	Representación de la transferencia de nitrógeno derivado de insectos a las plantas mediante asociación endófitas de <i>Metarhizium</i> con las raíces de la planta.	22
Figura 4	Esquema general del mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos.	27
Figura 5	Diagrama de obtención del inóculo y monóporicos.	42
Figura 6	Diagrama de experimentos para la evaluación de la tasa de crecimiento y período de incubación de aislados monospóricos de <i>Metarhizium</i> de México.	44
Figura 7	Diagrama de la obtención de microcultivos de los aislados de <i>Metarhizium</i> .	46
Figura 8	Procedimiento para evaluación de virulencia.	47
Figura 9	Procedimiento para evaluación de la asociación con raíces de plantas.	50
Figura 10	Esquema de la región correspondiente al rRNA.	54
Figura 11	Esquema de la región que codifica para TEF.	56
Figura 12	Diagrama de la obtención de aislados monospóricos y conservación en glicerol.	61
Figura 13	Aislados de <i>Metarhizium</i> con morfología atípica.	62
Figura 14	Aislados de <i>Metarhizium</i> de México en medio SDAY y APD.	63
Figura 15	Tasa de crecimiento en SDAY a 28 °C.	64
Figura 16	Micromorfología de aislados de <i>Metarhizium</i> .	65
Figura 17	Placa de 96 pozos con medio APD.	66
Figura 18	Larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas con aislados de <i>Metarhizium</i> de México.	67
Figura 19	Ejemplo de TL50 de algunos aislados de <i>Metarhizium</i> de México.	68
Figura 20	Cuantificación de ADN.	69
Figura 21	Geles con perfiles de bandas generados por RAPD-PCR.	71
Figura 22	Dendrograma de los aislados de México y cepas de referencia de <i>Metarhizium</i> obtenido por UPGMA.	72
Figura 23	Amplificación por PCR de las regiones ITS, TEF, Pr1 e IGS.	73
Figura 24	Análisis RFLP de la región 5' TEF y Pr1.	74
Figura 25	Árbol consenso de mayoría inferido por IB de las secuencias ITS1 e ITS2.	77
Figura 26	Árbol consenso de mayoría inferido por IB de las secuencias TEF.	79
Figura 27	Árbol consenso de mayoría inferido por IB concatenando las secuencias TEF e IGS.	82
Figura 28	Árbol consenso de mayoría inferido por IB de las secuencias IGS.	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Aislados de <i>Metarhizium</i> de México	39
Tabla 2	Cepas de referencia del género <i>Metarhizium</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS

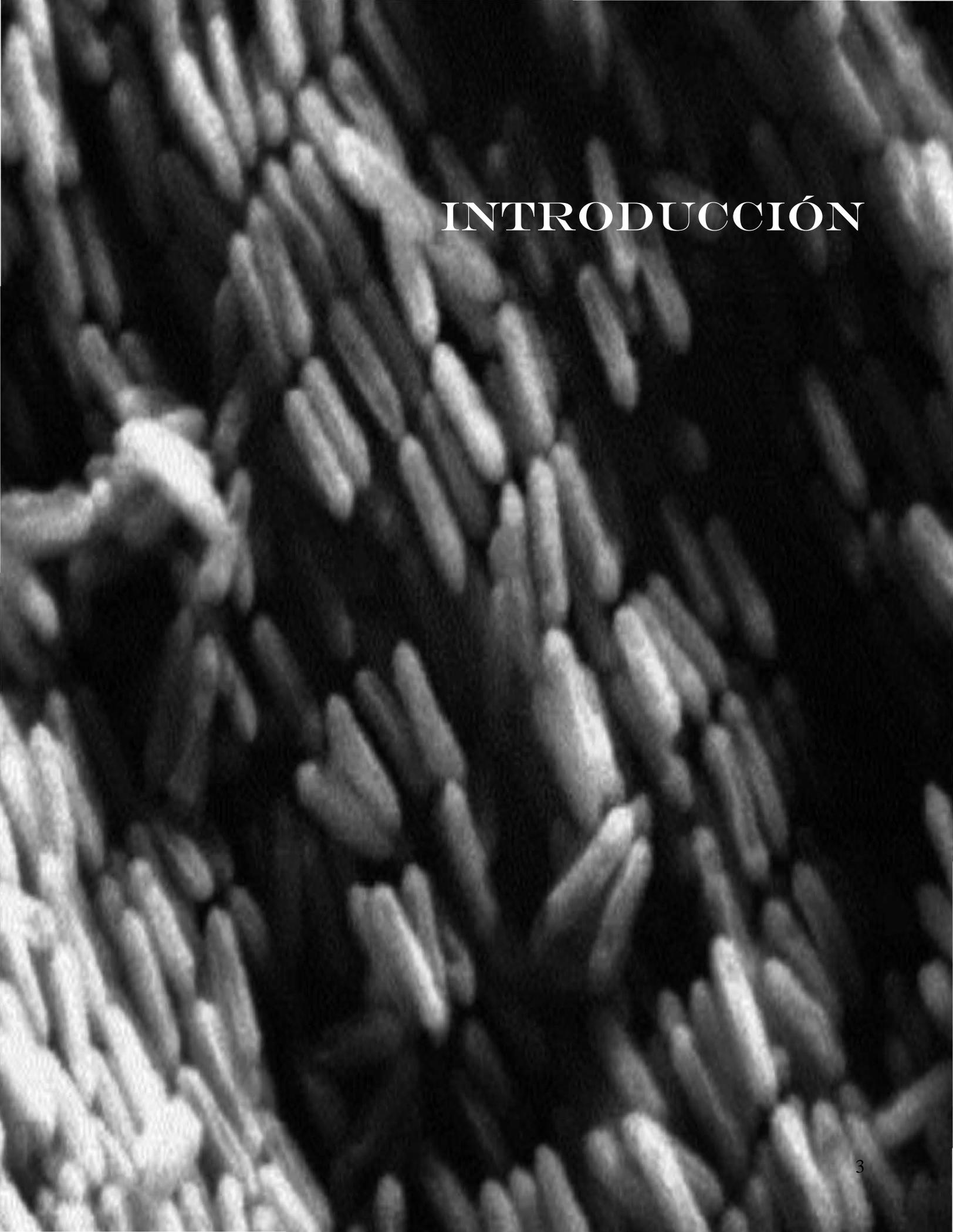
A₆₃₀	Absorbancia con una longitud de onda de 630 nm	mL	Mililitros
ADN	Ácido desoxiribonucleico	NCBI	National Centre for Biotechnology Information
ANOVA	Análisis de la varianza	ng	Nanogramos
APD	Agar Papa Dextrosa	nm	Nanometros
ARN	Ácido ribonucleico	OMS	Organización Mundial de la Salud
ARSEF	USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fulgal Cultures	pb	Pares de bases
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	PCR	Polymerase Chain Reaction
BSC	Biological Species Concept	pH	Potencial de hidrogeniones
BTUB	Beta tubulina	PHI	Pathogen-Host Interaction
CHE	Colección de Hongos Entomopatógenos	pmol	Picomol
cm	Centímetros	Pr1	Subtilisina
CNRCB	Centro Nacional de Referencia de Control Biológico	PSC	Phylogenetic Species Concept
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios	RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
CSIRO	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
DGSV	Dirección General de Sanidad Vegetal	RIP	Repeat-Induced Puntual Mutation
DL50	Dosis Letal Media	RPB1	RNA polymerase II large subunit 1
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato	RPB2	RNA polymerase II large subunit 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	rpm	Revoluciones por minuto
et al	"et allia"	rRNA	ARN ribosomal
GTR	Generalised time-reversible	SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
HMG	High Mobility Group	SDAY	Medio Sabouraud/Dextrosa/Agar/Levadura
IB	Inferencia Bayesiana	SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
IGS	Intergenic Sequences	SPD	Medio Sabouraud/Peptona/Dextrosa
ITS	Inter Transcribed Spacer	SSU	Small Subunit
LPG	Medio Levadura/Peptona/Glucosa	TBE	Amortiguador Tris base /Acido bórico/EDTA
M	Molar	TEF	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha
MAFFT	Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences	TL50	Tiempo Letal Medio
MAT	Gen Mating-Type	Tm	Temperatura de alineamiento
MCL1	Collagen-like protein	UFC	Unidades Formadoras de Colonias
MetaMx	Aislados de Metarhizium de México	UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
mg	Miligramo	USDA	United States Department of Agriculture
MgCl₂	Cloruro de magnesio	V	Volts
min	Minutos	µL	Microlitros

RESUMEN

Metarhizium es un género de hongos entomopatógenos ampliamente distribuidos en la naturaleza que además de ser considerablemente utilizados en control biológico son simbioses de raíces de plantas y algunas cepas podrían ser potencialmente útiles en aplicaciones agrícolas. Los estudios filogenéticos más recientes agrupan aproximadamente 33 especies diversas en el género *Metarhizium*. En México la mayoría de cepas y aislados de este género carece de una asignación filogenética basada en las regiones genéticas más resolutivas. Este estudio evaluó 43 aislados nativos procedentes de diferentes insectos hospederos y estados de la República Mexicana, los cuales fueron seleccionados debido a que fueron obtenidos de las principales plantaciones de caña de azúcar y de maíz en el país. Se evaluó la termotolerancia (8, 15, 28 y 35 °C), virulencia a insectos (TL50 en *Galleria mellonella*, Lepidoptera: Pyralidae), asociación con raíces de plantas, genotipificación por RAPD (T3B) y análisis filogenético de secuencias (utilizando 5´TEF, IGS y análisis RFLP). Los resultados mostraron que dentro de los aislados evaluados no hay crecimiento a bajas temperaturas y que el crecimiento es limitado a 35 °C. En los bioensayos realizados con *G. mellonella* la mayoría de aislados presentaron altos niveles de virulencia y además la capacidad de asociarse con raíces de *Phaseolus vulgaris* (Fabales: Fabaceae). Los análisis por RFLP con 5´TEF y Pr1 revelan tres grupos genéticos distintos. El análisis filogenético identificó los aislados nativos como *Metarhizium anisopliae* (n = 23), *M. robertsii* (n = 14), *M. guizhouense* (n = 4) y *M. pinghaense* (n = 2). Estos resultados demuestran la complejidad de las especies de *Metarhizium* y la necesidad del estudio de aspectos fisiológicos y filogenéticos para una evaluación más adecuada para su uso en sistemas agrícolas.

ABSTRACT

Metarhizium is a genus of entomopathogenic fungi widely distributed in nature that are considerably used in biological control and also some species are symbionts of plant roots and some strains could be potentially useful in agricultural applications. The most recent phylogenetic studies grouped approximately 33 different species in the genus *Metarhizium*. In México most of the isolates and strains of this genus do not have a phylogenetic assignment based on the most resolutive genetic regions. This study evaluated 43 native isolates from different host insects and Mexican states, which were selected because they were obtained from the main sugar cane and corn plantations in the country. Thermotolerance (8, 15, 28 and 35 °C), insect virulence (TL50 in *Galleria mellonella*, Lepidoptera: Pyralidae), association with plant roots, genotyping by RAPD (T3B) and phylogenetic analysis of sequences (using 5'TEF , IGS and RFLP analysis) were performed. The results showed that within the evaluated isolates there is no growth at low temperatures and the isolates showed a restricted growth at 35 ° C. In the bioassays made with *G. mellonella* the majority of isolates presented high levels of virulence and also the ability to associate with roots of *Phaseolus vulgaris* (Fabales: Fabaceae). RFLP analyzes with 5'TEF and Pr1 reveal three distinct genetic groups. Phylogenetic analysis identified native isolates as *Metarhizium anisopliae* (n = 23), *M. robertsii* (n = 14), *M. guizhouense* (n = 4) and *M. pinghaense* (n = 2). These results demonstrate the complexity of the species of *Metarhizium* and the necessity of the study of physiological and phylogenetic aspects for a more suitable evaluation for its use in agricultural systems.



INTRODUCCIÓN

El género *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) son hongos ascomicetos, distribuidos mundialmente, los cuales regulan naturalmente poblaciones de insectos, siendo capaces de infectar a más de 200 especies (muchas de ellas consideradas plagas agrícolas y forestales). Por lo cual, han sido usados como agentes de control biológico para el manejo y prevención de plagas que afectan cultivos de importancia económica, siendo el agente microbiano de la familia Clavicipitaceae más extensamente estudiado (Goettel et al. 2001). Las especies de este género son comúnmente encontradas en suelo como saprobios, mostrando simbiosis complejas, interacciones antagonistas con órdenes específicos de insectos (Vega et al. 2009) y con especies fúngicas patógenas de plantas (Sasan y Bidochka, 2012), endófitos (Behie et al. 2012), además de ser colonizadores (Hu y St. Leger, 2002) y presentar asociaciones específicas con la rizosfera de ciertas plantas (Wyrebeck et al. 2011). Diversos análisis filogenéticos han mostrado que el género *Metarhizium* se encuentra relacionado a los endosimbiontes fúngicos de pastos *Claviceps* y *Epichloë* (Spatafora et al. 2007) y que posee una relación más cercana a endófitos y patógenos de plantas que a patógenos de animales (Gao et al. 2011). Estas características sugieren que *Metarhizium* pudo haber evolucionado de un linaje de simbiosiontes de plantas, pero nunca abandonaron este rol y subsecuentemente adquirieron la habilidad de infectar y matar insectos como una adaptación que permitía el acceso a una fuente especializada de nitrógeno (Barelli et al. 2016).

Es evidente que desconocemos una gran fracción de la biodiversidad. En un estudio reciente, Mora et al. (2011) llegaron a la conclusión de que existen aproximadamente 8.7 millones de especies (± 1.3 millones) de eucariontes que no han sido descritas. En el caso de los hongos, se ha sugerido la existencia de entre 0.5 y 9.9 millones de especies (Schmit y Mueller, 2007), de los cuales solo se han descrito 100,000 especies (Blackwell, 2011). Los

hongos son un grupo diverso de organismos heterótrofos (nutrición por absorción), eucariontes, unicelulares (levaduras) o hifales (hongos filamentosos) y se reproducen por meiosis (esporas sexuales) y/o mitosis (asexuales). Actualmente, la clasificación del reino Fungi acepta un reino, un subreino (Dikarya), siete filas (Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Glomeromycota), diez subfilas, 35 clases, 12 subclases y 129 órdenes (Hibbett et al. 2007).

El principal método para diagnóstico de especies en hongos ha sido el concepto de especie morfológica (Morphological Species Concept, MSC). Aproximadamente 70,000 especies de hongos han sido diagnosticadas con base en caracteres morfológicos (Hawksworth et al. 1996) o mediante características fenotípicas (e.g. crecimiento a diferentes temperaturas, producción de metabolitos secundarios, presencia de pigmentos). Por otra parte, el concepto biológico de especie (Biological Species Concept, BSC), cuya definición de especie es: “Un grupo de poblaciones naturales con entrecruzamiento, la cual está aislada reproductivamente de otros grupos” (Mayr, 1940), ha sido utilizado para identificar grupos de individuos que tienen la capacidad de reproducirse sexualmente, sin embargo, es imposible aplicar la prueba de apareamiento a hongos que no llevan a cabo la meiosis (meiosporas), siendo esto un problema, ya que aproximadamente el 20% de las especies de hongos solamente se conoce su estado asexual (Reynolds, 1993). Otros hongos son homotálicos y pueden producir esporas sexuales por sí mismos, con este tipo de hongos la presencia de meiosporas no es suficiente para inferir apareamiento, además de que los hongos que son heterotálicos muchas veces no pueden ser sometidos a pruebas de apareamiento en cultivos. Por otra parte, se encuentra el concepto de especie filogenética (Phylogenetic Species Concept, PSC), en el cual se busca el agrupamiento de taxones más pequeño en el cual se comparte un patrón de ancestría y descendencia (Cracraft, 1983), sin embargo,

muchos consideran subjetivo el uso de un solo gen o carácter para el reconocimiento de especies, por lo que se ha propuesto el uso de más de un locus polimórfico, en donde las genealogías generadas con diferentes loci deben de ser concordantes dentro de una especie debido a los efectos de aislamiento genético y deriva génica (Taylor et al. 2000). Se ha visto que varios de estos conceptos pueden llegar a conclusiones distintas, como en el estudio realizado al complejo de *Pleurotus ostreatus*. Vilgalys y Sun (1994) identificaron ocho grupos interestériles o especies biológicas en este complejo y utilizaron la variación que existía dentro de estas especies en el rRNA para realizar un análisis filogenético de individuos de cada especie biológica. Tres de las especies biológicas (I, II y VI) contenían mas de una especie filogenética y en cada caso estas especies fueron encontradas en diferentes continentes en el Hemisferio Norte. Lo que se consideraban tres especies biológicas (BSC), pasaron a nueve especies filogenéticas (PSC).

En el reino Fungi, el sexo esta definido por el locus del “mating type” (*MAT*). La composición del locus varía dramáticamente entre especies, pero hay dos genes *MAT* que se encuentran siempre en ascomicetos filamentosos, *MAT-1* y *MAT-2* (Martin et al. 2011). Estas dos formas alternativas son llamadas idiomorfos en oposición a alelos, dada la alta divergencia entre ellas (Lee et al. 2010). Aunque algunos hongos se reproducen sexualmente de manera obligada, la mayoría puede reproducirse sexual y asexualmente y sólo una minoría es exclusivamente asexual (Sun y Heitman, 2011). Sharon et al. (1996) demostraron con cepas transgénicas de *Cochliobolus heterostrophus* (fase sexual) y de *Bipolaris sacchari* (fase asexual), que la persistencia de la asexualidad de *B. sacchari* no se debe a la ausencia o falta de funcionalidad de los genes *MAT*, sino que se debe adjudicar a otro gen durante el desarrollo de peritecios. Entre grupos de especies cercanamente relacionadas, las especies sexuales suelen estar mezcladas filogenéticamente con las asexuales (Taylor et al. 1999), lo

que ha llevado a proponer que la reproducción sexual se pierde durante la evolución. Una explicación alternativa es que el sexo no ha sido detectado en los grupos que se creen asexuales (Sun y Heitman, 2011). Actualmente, el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Artículo 59), ha sugerido el uso de un nombre para cada hongo independientemente de su estado de vida (anamorfo o teleomorfo) (McNeill et al. 2012).

Anteriormente, en el género *Metarhizium* la reproducción se consideraba principalmente asexual, sin embargo, Liang et al. (1991) fueron los primeros en observar una conexión de *Metarhizium* con el teleomorfo *Cordyceps*. Posteriormente, *M. anisopliae* var. *majus* fue confirmado como el anamorfo de *Cordyceps brittlebankisoides*, basados en la similitud de las características de las ascosporas obtenidas del tejido estromal de *C. brittlebankisoides*, así como la similitud de las secuencias ITS del rADN (Liu et al. 2002). Los estados sexuales de las especies del género *Metarhizium* fueron transferidas de *Cordyceps* a *Metacordyceps* por Sung et al. (2007). Posteriormente, debido a que en el género *Metarhizium* el estado sexual *Metacordyceps* se encuentra disperso entre varios géneros anamorfos (*Pochonia*, *Nomuraea* y *Paecilomyces*) Kepler et al. (2014) realizó un análisis multigénico (*BTUB*, *RPB1*, *RPB2* y *TEF*) para poder aclarar las relaciones entre estos taxones. El resultado de este análisis apoya la combinación de especies del género *Metarhizium* con la mayoría de las especies reconocidas en *Metacordyceps*, así como las del género *Nomuraea* y *Chamaeleomyces*.

Mas evidencia sobre sexualidad surgió al realizar la secuenciación del genoma de *M. acridum* y *M. robertsii* por Gao et al. (2011), así como la fuerte tendencia a mutaciones puntuales por duplicación (Repeat-Induced Puntual Mutation, RIP) que presenta *M. acridum*, siendo que estas mutaciones son únicamente funcionales cuando la meiosis es frecuente. Además, tanto *M. acridum* como *M. anisopliae*, poseen un complemento de genes aparentemente funcionales cuyos ortólogos en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* se conocen por ser requeridos para la meiosis y el desarrollo sexual. Esto incluye genes

putativos mating-type α y genes HMG (High Mobility Group), sugiriendo que pueden tener el potencial para ser tanto homotálicos como heterotálicos bajo las condiciones adecuadas. Los genes HMG están involucrados en la sexualidad y patogenicidad de hongos. Tanto *M. anisopliae*, como *M. acridum*, poseen cuatro proteínas HMG que se cree que sean genes relacionados a las interacciones patógeno-hospedero (Pathogen-Host Interaction, PHI). Por otra parte, en ese mismo estudio se sugirió que la conservación de genes sexuales en especies asexuales puede ser debido a una reciente pérdida de la sexualidad, pleiotropía o recombinación parasexual.

Las herramientas moleculares han ganado gran importancia en la taxonomía y sistemática de los hongos, facilitando el entendimiento de su evolución, ayudando a definir especies crípticas y elucidar la biología de la reproducción de hongos. La revolución molecular en la taxonomía fúngica comenzó a inicios de 1990, con los análisis de genes del ARN ribosomal (rARN) (White et al. 1990).

Dentro de los loci mas utilizados para la inferencia en la filogenia de hongos se encuentran la subunidad pequeña del rARN (small subunit rARN, SSU rADN) utilizado, por ejemplo, para la filogenia de hongos patógenos dematiáceos por Spatafora et al. (1995). El gen que codifica para el Factor de elongación 1 alfa (TEF), fue sugerido para la inferencia filogenética de eucariontes (Geiser et al. 2004), además de ser utilizado ampliamente para la identificación de aislados de especies de hongos como *Fusarium* (Rahjoo et al. 2008) y *Aspergillus* (Perrone et al. 2011). Los microsatélites, como en el caso del trabajo de Fisher et al. (2002), se utilizaron para el análisis filogenético de 20 aislados clínicos de *Coccidioides immitis*; y el espaciador interno transcrito (Internal Transcribed Spacer, ITS) del rARN está siendo utilizado como código de barras para el reino Fungi (Schoch et al. 2012). Entre otros loci también utilizados en la filogenia de estos microorganismos se encuentran β -tubulina

(Bischoff et al. 2009), calmodulina (Carvalho et al. 2003) y genes de ARN polimerasa (largest subunit of ARN polymerase II RPB1 y second largest subunit of ARN polymerase II, RPB2) (Liu et al. 2006). Sin embargo, la investigación filogenética es a menudo obstaculizada por la selección de marcadores moleculares que llevan a una pobre resolución. A pesar de que existen diversas reglas generales para la selección de genes utilizados para inferir relaciones filogenéticas (e.g. el porcentaje de divergencia o la proporción de sitios informativos en parsimonia), convencionalmente la selección se realiza con base en la pregunta filogenética de interés. Sin embargo, su uso es altamente dependiente del contexto.

El estudio de la evolución de hongos, la determinación de relaciones y la delimitación de especies no es la excepción al problema de selección de marcadores moleculares. En respuesta a esta problemática, Townsend (2007) propuso un método que mide el poder de un gen de resolver particiones en un árbol filogenético en una escala de tiempo y es capaz de hacer la selección de los marcadores moleculares apropiados a la época de interés, basados en la distribución total estimada de las tasas a través de los caracteres. Este método produce una apreciación gráfica de la señal genética para cualquier época histórica. Para estimar la informatividad filogenética se requieren datos previos de las tasas de evolución molecular para cada sitio de un locus. Esta información previa puede ser obtenida de tres diferentes fuentes: 1) datos preliminares de los loci candidatos de un subconjunto estudiado de los taxones de interés; 2) datos de los loci candidatos de un clado cercano estudiado; 3) datos genómicos comparativos de secuencias genómicas dentro o fuera del clado de interés. Los perfiles de informatividad filogenética proporcionan una medida cuantitativa para priorizar el muestreo de genes (Lopez-Giráldez et al. 2013). Para el género *Metarhizium*, Rehner y Kepler (2013) utilizando las secuencias de los genomas nucleares de las especies *M. acridum* y *M. robertsii*, identificaron regiones conservadas de genes sinténicos y a partir de esto desarrollaron oligonucleótidos para la amplificación de las

regiones intergénicas de siete loci. Posteriormente, realizaron la determinación de los loci más adecuados para la inferencia filogenética a nivel de especie de este género comparando los loci utilizados en trabajos previos (Bischoff et al. 2009) con las regiones intergénicas. Esto se realizó utilizando el método de perfiles informativos de Townsend (2007), demostrando que al llevar a cabo este método para conocer la informatividad filogenética de los loci, el seleccionado, recupera la topología correcta, así como valores más elevados en el apoyo de ramas. De los loci evaluados en el estudio de Rehner y Kepler (2013), los datos de las secuencias derivadas de regiones intergénicas (1,105 pb) adyacentes a una proteína hipotética, resultaron más variables y filogenéticamente más informativos que los marcadores previamente disponibles (ITS, TEF).

HIPÓTESIS

La evaluación de parámetros fisiológicos y filogenéticos de aislados nativos de México contribuirá a esclarecer de acuerdo a las últimas revisiones taxonómicas internacionales la diversidad genética de éste género en el país.

JUSTIFICACIÓN

Metarhizium es un género de hongos entomopatógenos cuya importancia en el control biológico de diversas plagas ha llevado a la necesidad de caracterizar aislados fenotípicamente por cuestiones de patentes y bioseguridad. La filogenia de este género aún no se encuentra completamente resuelta, y la información concerniente a los aislados provenientes de México es aun más escasa. Por lo tanto, en vista de la aplicación actual de *M. anisopliae* en diversos estados de México, es necesario conocer su filogenia y contribuir al estudio de su diversidad genética. Se propone en esta investigación un análisis fenotípico en cuanto a su micro y macromorfología, evaluación de características fisiológicas, como la tolerancia a temperaturas frías y cálidas, preferencias de hábitat, virulencia en insectos y asociación con raíces de plantas, además de la caracterización genotípica de los aislados mediante RAPD-PCR y RFLP y un análisis filogenético usando las regiones ITS, IGS y TEF. Este conocimiento puede brindar un enfoque más racional para la utilización de cepas nativas de *Metarhizium* para el control de plagas, así como de asociación endófitas en cultivos agrícolas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar características fisiológicas y esclarecer la situación filogenética de 43 aislados de *Metarhizium* seleccionados por representar las principales áreas agrícolas de México respecto a los análisis filogenéticos más actuales sobre el género.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener aislados monospóricos (n = 5) a partir de los 43 cultivos polispóricos de *Metarhizium* de México.
- Caracterizar fenotípicamente los aislados de *Metarhizium* de México obtenidos de diversos hospederos, con base en su macro y micromorfología.
- Evaluar características fisiológicas de los aislados: termotolerancia (8, 15, 28, 35 °C), tasa de crecimiento, virulencia por bioensayos en *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) y su asociación endófito con raíces de *P. vulgaris*.
- Caracterizar genotípicamente los aislados de *Metarhizium* de México mediante RAPD y RFLP.
- Realizar un análisis filogenético de los aislados monospóricos, mediante el uso de regiones ITS, IGS y TEF.



ANTECEDENTES

***Metarhizium*, clasificación y filogenia**

El género *Metarhizium* fue descrito por primera vez por Sorokin en Ucrania en 1870 al descubrir larvas de *Anisopliae austriaca* infectadas con el hongo, proponiendo el nombre de *Entomophthora anisopliae*. Posteriormente, Metschnikoff en 1880 lo renombra como *Isaria destructor*. Tres años después Sorokin propone el nombre del género *Metarhizium*. Algunas especies como *M. album*, *M. brunneum* y *M. chrysorrhoeae* fueron descritas antes de la clasificación realizada por Tulloch (1976) y Rombach et al. (1987). Las clasificaciones iniciales se basaban únicamente en caracteres morfológicos. Tres especies fueron identificadas *M. album*, *M. anisopliae* y *M. flavoviride*, cada una con sus respectivas variedades. Las etapas iniciales de la inclusión de datos moleculares (isoenzimas, análisis RAPD y RFLP) y características fisiológicas permitieron vislumbrar especies o variedades dentro del mismo género (St. Leger et al. 1992; Bidochka et al. 1994; Cobb y Clarkson 1993; Curran et al. 1994; Fungaro et al. 1996). Fue hasta la revisión taxonómica realizada por Driver et al. (2000) en donde utilizando un enfoque filogenético con el análisis de la región ITS, 28S (D3) del ADN ribosomal (rADN) y patrones RAPD, además del análisis de dimensiones de conidios de diferentes especies del género, describieron 10 distintos clados monofiléticos dentro del género *Metarhizium*. Sin embargo, debido a la falta de sitios informativos en las regiones ITS, la mayoría de las relaciones en *M. anisopliae* no fueron totalmente resueltas, así como la situación de algunos taxones en *M. flavoviride*.

Posteriormente, Bischoff et al. (2006) describieron a *M. frigidum* como una especie críptica dentro de *M. anisopliae*. En el 2009 los mismos autores realizaron un análisis filogenético multilocus, utilizando las regiones TEF, RPB1, RPB2 y β -tubulina, para aclarar la situación taxonómica dentro de los complejos *M. flavoviride* y *M. anisopliae*. De los loci utilizados, los intrones dentro del 5' TEF, brindaron mayor información en cuanto a variación nucleotídica y

en cuanto al grado de resolución filogenética de clados terminales dentro de *Metarhizium*. Los resultados de estos estudios, y en diversos casos la evidencia morfológica, apoyan la monofilia de nueve taxa terminales en el complejo de especies de *M. anisopliae*. Proponiendo con rango de especie a *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pinghaense*, *M. acridum* stat. nov., *M. lepidiotae* stat. nov. y *M. majus* stat. nov., *M. brunneum*, además de describir las nuevas especies de *M. globosum* y *M. robertsii* (Bischoff et al. 2009). Actualmente, el género *Metarhizium* comprende 30 especies (estados anamorfos y teleomorfos), dentro de las cuales se encuentran algunas anteriormente reconocidas en *Metacordyceps*, *Nomuraea* y *Chamaeleomyces* (Kepler et al. 2014) (Fig. 1). Además, nuevas especies continúan describiéndose basadas en un análisis multilocus como *M. synnematis* (Hua-Li et al. 2016) y *M. dendrolimatilis* (Chen et al. 2017).

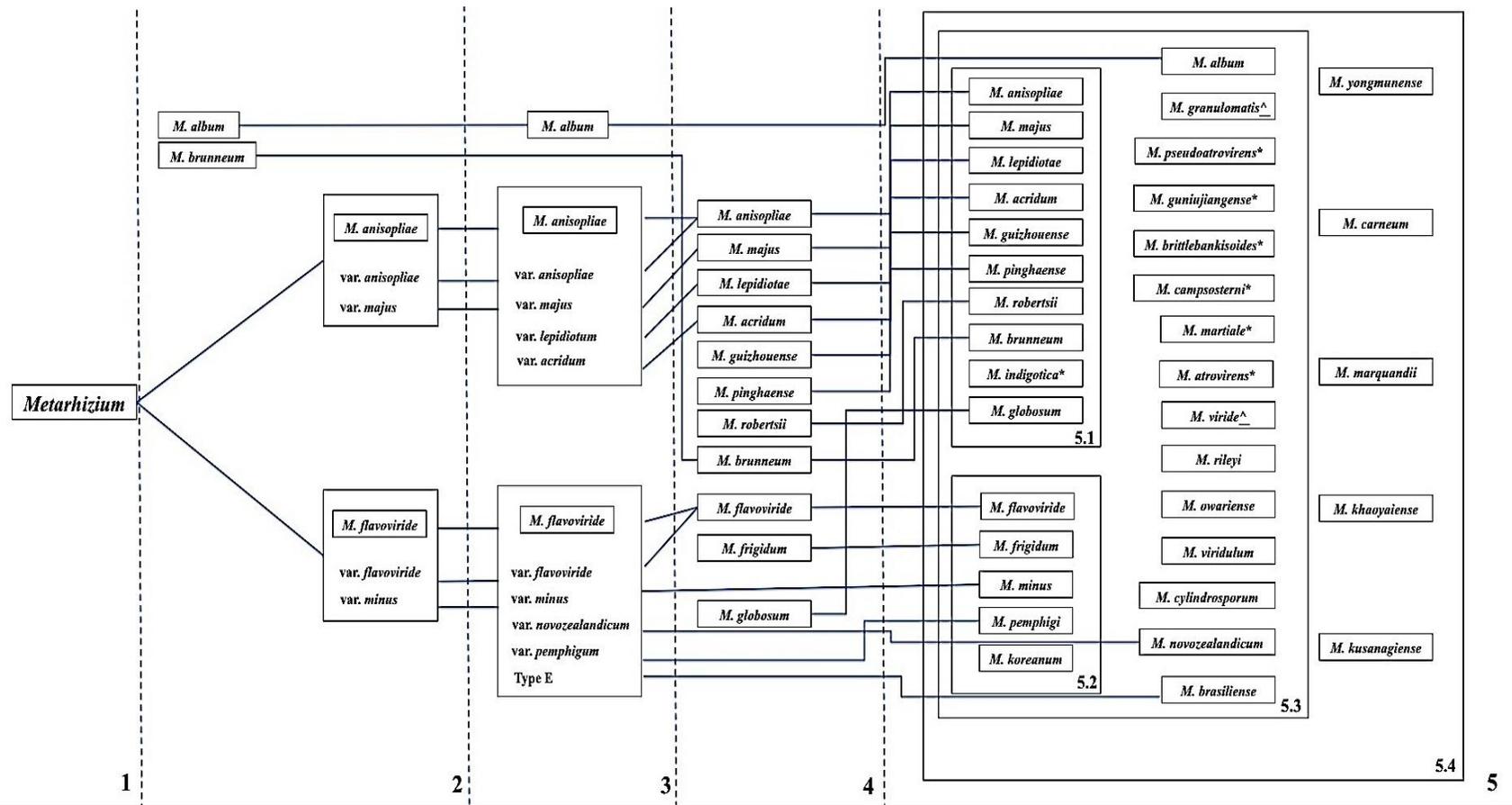


Fig. 1. Clasificaciones del género *Metarhizium*.

1 = Sorokin (1883)

2 = Petch (1931 ; 1935); Tulloch (1976), Rombach et al. (1986; 1987) and Samson et al. (1988)

3 = Driver et al. (2000)

4 = Bischoff et al. (2006) y (2009)

5 = Kepler et al. (2014); 5.1 = *M. anisopliae* complex; 5.2 = *M. flavoviride* complex; 5.3 Core *Metarhizium*; 5.4 = *Metarhizium*

* Teleomorfos

^ Hospedero (Squamata: Chamaeleonidae)

Morfología

Metarhizium spp. incluyen estados anamorfos que no producen sinemas y recientemente se han incluido estados teleomorfos, anteriormente reconocidos dentro de *Metarcordyceps* (Sung et al. 2007). Los conidióforos son ramificados, ocasionalmente simples en algunas especies, con ápices que soportan de una a varias fiálides, las cuales pueden ser cortas o largas (Fig. 2). Los conidios son basípetos y catenulados y pueden ser hialinos o con tonalidades lilas, pardas, o verdosas (Kepler et al. 2014). Pueden variar en forma (cilíndrico, globoso, elipsoidal) y tamaño (de 4.0-14.5 x 2.0-5.0 μm), siendo *M. majus* la especie con los conidios más grandes (8.5-14.5 x 2.0-2.5 μm) y *M. acridum* con los más pequeños (4.0-5.5 x 2.0-3.0 μm) (Driver et al. 2000; Bischoff et al. 2009). Estas estructuras asexuales son el único carácter morfológico capaz de diferenciar diversas especies dentro de este género, excepto en especies muy cercanamente relacionadas como son *M. pinghaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. brunneum*, las cuales conforman el clado PARB descrito por Bischoff et al. (2009).

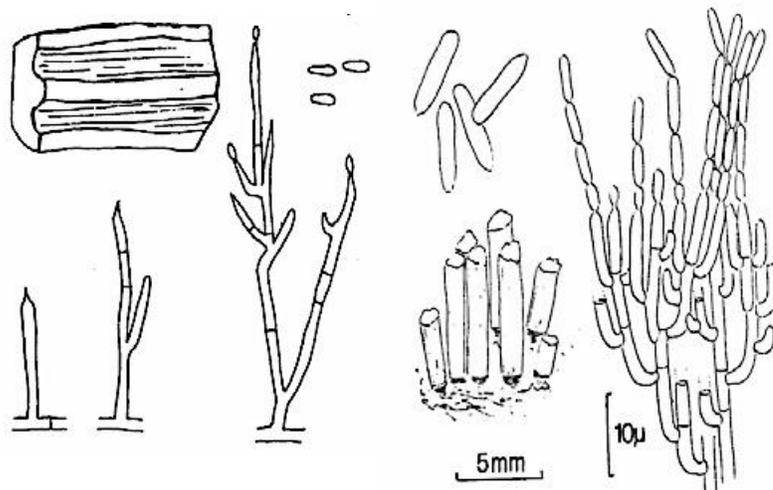


Fig. 2. Morfología del conidióforo, fiálides, conidios y columnas de conidios de *M. anisopliae* (Barron, 1983; Watanabe, 1994).

A pesar de la importancia de esta especie en el control biológico, han existido limitantes para determinar su clasificación y filogenia. El entendimiento de la verdadera diversidad y ecología de estos organismos se encuentra obstaculizado por las morfologías convergentes que presentan las especies dentro de *Metarhizium* (Kepler y Rehner, 2013). Las colonias maduras de *Metarhizium* (8-9 días) son predominantemente verde oscuro, verde claro, blancas o pardas, pudiendo presentar dos colores en el centro. Los bordes pueden ser blancos con grosor variable y los reversos de las colonias pueden presentar tonalidades pardas, anaranjadas, amarillentas o ser incoloras (Fernandes et al. 2009). La morfología de las colonias puede diferir dependiendo del tipo de medio (Kamp y Bidochka, 2002), la edad, múltiples pases (Wang et al. 2005) y otros factores.

Diversidad genética

En el caso de *Metarhizium* la diversidad y ocurrencia de especies no es aleatoria y se ha atribuido a un conjunto de diversos factores (hábitat, condiciones climáticas, plantas y/o hospederos). Las especies dentro de este género son mesofílicas con crecimiento de 10 a 40 °C, una temperatura óptima de germinación y crecimiento de 25 a 30 °C (Roberts y Campbell, 1977) y una temperatura de muerte térmica para los conidios cercana a 50 °C (Walstad et al. 1970), aunque algunas cepas presentan actividad en temperaturas bajas y tolerancia a temperaturas elevadas (Bidochka et al. 2001). A pesar de que no existe evidencia entre la latitud y la tolerancia a bajas o altas temperaturas, las cepas con tolerancia a bajas temperaturas se han reportado en zonas del hemisferio norte y latitudes no menores a 43.5 °, mientras que se ha observado que algunos aislados de regiones tropicales son capaces de crecer a temperaturas arriba de 35 ° C (Bidochka et al. 1998).

Diversos estudios han demostrado que la riqueza de especies varía entre diferentes regiones, siendo *M. robertsii* la especie dominante en Ontario (Wyrebeek et al. 2011); *M. brunneum* en Oregon y Dinamarca (Fisher et al. 2011; Steinwender et al. 2014); *M. anisopliae* en Brazil y México (Rezende et al. 2015; Brunner-Mendoza et al. 2017a) y *M. pingshaense* en Japón (Nishi et al. 2011). Por otro lado, la comunidad de especies de *Metarhizium* ha sido ligada a hábitats agrícolas y forestales (Bidochka et al. 2001; Douglas et al. 2008; Rocha et al. 2011; Steinwender et al. 2014; Kepler et al. 2015), ya que la distribución y abundancia de las especies de este género esta relacionada a la presencia de ciertos tipos de plantas (Wyrebeek et al. 2011; Kepler et al. 2015).

Estudios de diversidad y genética de poblaciones en suelos agrícolas mexicanos (Guanajuato) usando técnicas morfológicas y moleculares (TEF, ITS y B- tubulina) revelan una gran diversidad de especies de *Metarhizium* (*M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. pingshaense*) infectando gusanos blancos (Coleoptera: Melolonthidae) comparado con las especies encontradas de *Beauveria* (únicamente *B. pseudobassiana*) (Carrillo-Benítez et al. 2013). En otro estudio que evaluó la abundancia relativa y diversidad de hongos entomopatógenos en once diferentes zonas geográficas de suelos agrícolas de México, encontraron una baja frecuencia de aislados de *Metarhizium* comparada con *Beauveria* (Pérez-González et al. 2014). Por otro lado, Hernández-Domínguez y Guzmán-Franco (2017) reportaron *M. anisopliae* s.s. como la especie más abundante en muestras de suelos y hojas en plantaciones de caña de azúcar (Oaxaca). En el caso de aislados obtenidos de *Aeneolamia postica* (Hemiptera: Cercopidae) en sembradíos de caña de azúcar en Tabasco, se evidenció por RAPD y secuencias ITS-rADN variabilidad intraespecífica en los genotipos de *M. anisopliae* (Bautista-Gálvez y González-Cortés, 2005).

Asociación con raíces de plantas

La rizósfera es definida como una zona de interacciones únicas y dinámicas entre las raíces de plantas y los microorganismos del suelo (Curl y Truelove, 1986) influenciada por diversos factores químicos, físicos y biológicos (como los exudados de las raíces, las condiciones del suelo, etc). Los hongos son el segundo grupo de microorganismos en suelos, tras las bacterias (Fitter y Garbaye, 1994), teniendo interacciones con las plantas que pueden ser benéficas, neutras o dañinas.

Los hongos endófitos son colonizadores de una planta que no causan enfermedad aparente (Schulz y Boyle, 2005) y pueden encontrarse en hojas, tallos y raíces, pudiendo ser tejido-específicos (Tao et al. 2008). Los endófitos presentan diferentes funciones como: el aumento de la resistencia de pastos a múltiples factores de estrés (Endófitos Clavicipitaceae), decremento de herbivoría y aumento de crecimiento en plantas (Endófitos no Clavicipitaceae). Estudios recientes han puesto en evidencia la versatilidad ecológica y metabólica de *M. robertsii*, ya que además de ser patógeno de insectos, se han identificado interacciones con la rizósfera de ciertas plantas (Wang y St. Leger, 2007; St. Leger et al. 2011), así como su rol antagonista con ciertos fitopatógenos y el estímulo al desarrollo de las raíces de ciertas plantas (Sasan y Bidochka, 2013), además de tener la capacidad de movilizar nitrógeno derivado de insectos a las plantas (Behie y Bidochka, 2013) (Fig. 3).

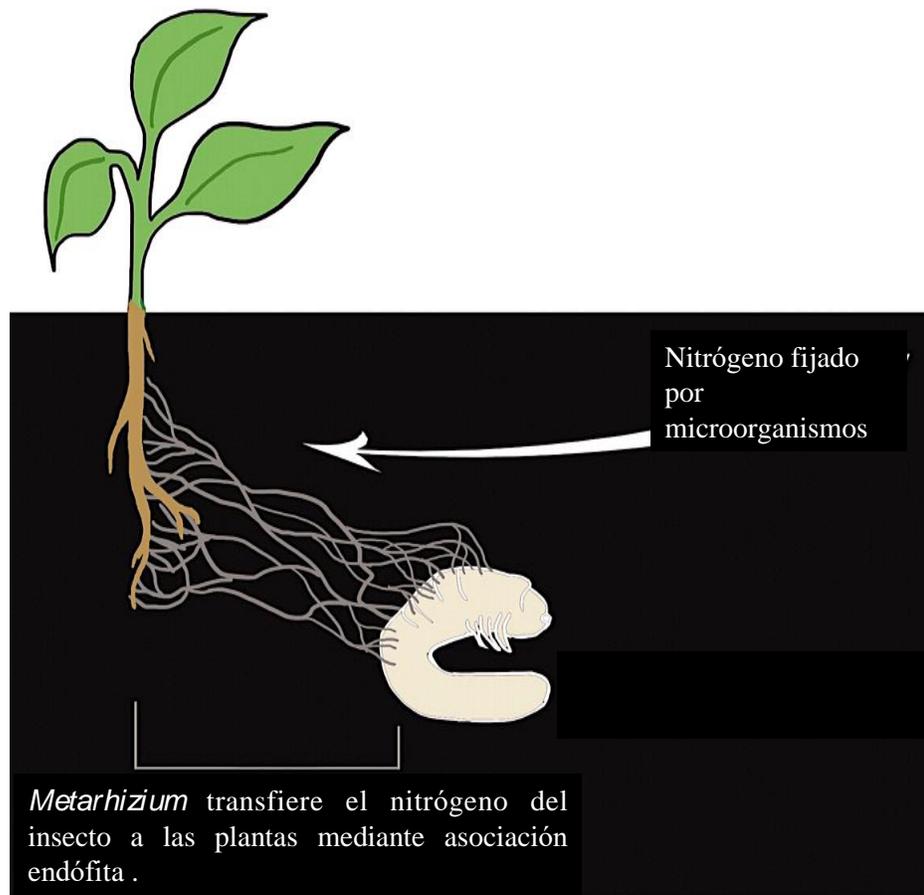


Fig. 3. Representación de la transferencia del nitrógeno derivado de insectos a las plantas mediante asociación endófitas de *Metarhizium* con las raíces de la planta. Modificado de Behie et al. 2012.

Éxito evolutivo y diversificación en el mecanismo de infección

Los hongos entomopatógenos han tenido que cumplir una serie de retos para producir suficientes conidios/esporas en cada generación para mantener sus poblaciones viables mediante mecanismos fisiológicos y rasgos estructurales que han evolucionado de forma convergente entre los tres principales linajes de hongos patógenos de insectos, los cuales son: Hypocreales (la mayoría de géneros), Entomophthoromycota (órdenes *Entomophthorales* y *Neozygiales*) y Onygenales (género *Ascosphaera*). El mecanismo de infección comienza cuando insectos susceptibles entran en contacto con conidios de la vegetación, suelo o aire (Hesketh et al. 2010). La adhesión requiere un número elevado de conidios e interacciones con las proteínas de la superficie de la epicutícula del insecto hospedero (Fig. 3). Las especies de Hypocreales necesitan una gran cantidad de conidios para lograr la infección en comparación con las especies de Entomophthorales cuyos conidios son más grandes, lo que les permite sujetarse firmemente a la cutícula del insecto completando así el proceso de adhesión. Sin embargo, el producir grandes cantidades de conidios probablemente maximice el éxito reproductivo por dispersión pasiva (el viento y otros factores ambientales). En contraste, las especies de *Ascosphaera* infectan únicamente a su hospedero (larvas de *Apis mellifera* o *Megachile rotundata*) solo tras la ingestión de las esporas (Boomsma et al. 2014).

En *M. anisopliae* la adhesión de conidios a la epicutícula del hospedero es un mecanismo hidrofóbico no específico (Thomas y Read, 2007; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Los principales genes involucrados en este proceso son *Mad1* (proteína de adhesión) (Wang y St. Leger, 2007) y *ssgA* (hidrofobina) (St. Leger, 1992). La pérdida de *Mad1* no solo reduce la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto sino también reduce la germinación, producción de blastosporas y virulencia. Por su parte, el gen *Mad2* parece tener importancia

en la interacción/adhesión con plantas y no posee efecto sobre la adhesión sobre la cutícula del insecto (Wang y St. Leger, 2007).

El segundo paso en el mecanismo de infección es la germinación de los conidios. Existen diversos factores que limitan la germinación, como la temperatura, la radiación, la humedad, etc. La mayor parte de los hongos entomopatógenos requieren una humedad relativa de >90 % para su germinación. Pese a que el macroclima muchas veces no presente estas condiciones, el microclima del follaje brinda los requerimientos adecuados (Roberts y Humber, 1981). Algunos aislados de *M. anisopliae* muestran germinación, crecimiento y potencial de esporulación arriba de los 37 °C y pueden tolerar hasta 4 horas de exposición a radiación UV-B (Braga et al. 2001; Mustafa y Kaur, 2008). Tras la etapa de germinación, el desarrollo del apresorio requiere altas concentraciones de energía en las cuales están involucrados iones de Ca^{+2} y cAMP (Clarkson et al. 1998). Posteriormente, se forman las clavijas de penetración e infección que tienen la capacidad de encontrar sitios adecuados para acceder a capas internas del exoesqueleto (Cole et al. 1991). Este paso involucra actividades enzimáticas y físicas (presión mecánica). Los hongos entomopatógenos secretan proteasas, quitinasas y lipasas que degradan la mayor parte de los constituyentes del hospedero (proteínas, quitinas y lípidos), permitiendo la penetración de la cutícula (Da Silva et al. 2005; Boldo et al. 2009). *Metarhizium* produce diversas proteasas como subtilisinas (Pr1), tripsinas (Pr2), cisteinas-proteasas (Pr4) y metaloproteasas (St. Leger et al. 1998; Sánchez-Pérez et al. 2014), las cuales además de degradar las proteínas de la cutícula son un componente significativo en la adquisición de nutrientes, evasión de la respuesta inmune del hospedero al degradar proteínas antifúngicas, y regulación del pH (St. Leger et al. 1999). La transición evolutiva del género *Metarhizium* que lo constituyó como patógeno de insectos debió haber involucrado adaptaciones del metabolismo fúngico en cuanto a los componentes

bioquímicos de la cutícula de éstos, como lo indica el gran número de proteasas, lipasas y quitinasas que pueden digerir la cutícula del insecto hospedero (Boomsma et al. 2014). Por otra parte, las proteasas han sido el resultado de preservación por selección natural de genes duplicados. Se considera que esto facilitó la adaptación a ambientes heterogéneos. La capacidad de producir grandes cantidades de proteasas permite la rápida degradación de las barreras del hospedero, pero la diversidad de proteasas se atribuye a que los insectos frecuentemente aprovechaban los inhibidores de las proteasas antifúngicas (Gao et al. 2011). Tras la penetración de la cutícula, la respuesta inmune del hospedero se estimula, activando mecanismos de defensa como la producción de fenoloxidasas, formación de hemocitos y procesos de melanización. Una vez dentro del hemocele del insecto, se presenta una diferenciación celular de hifa a blastospora y/o cuerpos hifales, los cuales se distribuyen de forma pasiva en el hemocele del hospedero intentando evadir el sistema inmune (Wang y St. Leger, 2006) e invadiendo otros tejidos mientras el hongo continúa tomando nutrientes como la trehalosa, que es el principal disacárido encontrado en la hemolinfa del insecto y para el cual *Metarhizium* produce grandes cantidades de enzima trehalasa (Schrank y Vainstein, 2010). El cuerpo graso es uno de los primeros órganos colonizados por el patógeno y los tejidos musculares son los últimos (Schneider et al. 2013). Las especies de Hypocreales y Onygenales presentan hifas septadas que pueden invadir el espacio intersticial entre las fibras musculares. Algunas especies de Hypocreales producen sustancias inmunomoduladoras que suprimen el sistema de defensa del hospedero (Thomas y Read, 2007) y toxinas que se pueden encontrar en etapas avanzadas de la infección. *M. anisopliae* produce destruxinas A, B y E (metabolitos secundarios, más específicamente depsipéptidos cíclicos), las cuales exhiben un amplio espectro de actividades insecticidas que afectan ciertos componentes de la respuesta inmune celular del insecto como la encapsulación y fagocitosis (Liu et al. 2004). Estas toxinas juegan un papel importante en la patogénesis

(Samuels et al. 1988) y debilitamiento de la respuesta inmune del hospedero, induciendo parálisis flácida, causando alteraciones celulares, dañando el sistema muscular, intestino medio y los túbulos de Malpighi, afectando la excreción y dificultando la alimentación y movilidad del hospedero (Dumas et al. 1994). En el caso de *M. acridum*, al infectar a la langosta (Orthoptera: Acrididae), al tercer o cuarto día de infección, ésta ya no tiene capacidad de movimiento, probablemente por la invasión y destrucción de los músculos y tejidos de las extremidades posteriores por los propágulos del hongo (Toriello et al. 2011). El hongo patógeno debe utilizar adecuadamente los nutrientes obtenidos del cadáver del hospedero, optimizar la producción de esporas y lograr una dispersión bajo las condiciones ambientales prevalentes. Debe existir un balance entre el crecimiento del hongo y la producción de toxinas, ya que la alta producción de toxinas puede ocasionar la muerte del hospedero antes de que el hongo logre acumular la masa celular necesaria para el desarrollo de estructuras productoras de conidios (Boomsma et al. 2014). El hongo puede utilizar el azúcar para su nutrición y al mismo tiempo reducir la disponibilidad de ésta para la nutrición del propio hospedero (Zhao et al. 2014). Conforme la infección avanza, los nutrientes comienzan a agotarse y el hongo produce hifas y otras estructuras que emergen del cuerpo del insecto, esporulando y comenzando nuevamente el ciclo de infección al inocular a hospederos susceptibles directa o indirectamente por vía aérea o por conidios depositados en el suelo y vegetación, causando epizootias (Sanchez-Perez et al. 2014). Los conidios pueden sobrevivir en el ambiente durante periodos prolongados de tiempo, dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas del entorno (Boomsma et al. 2014) (Fig. 4).

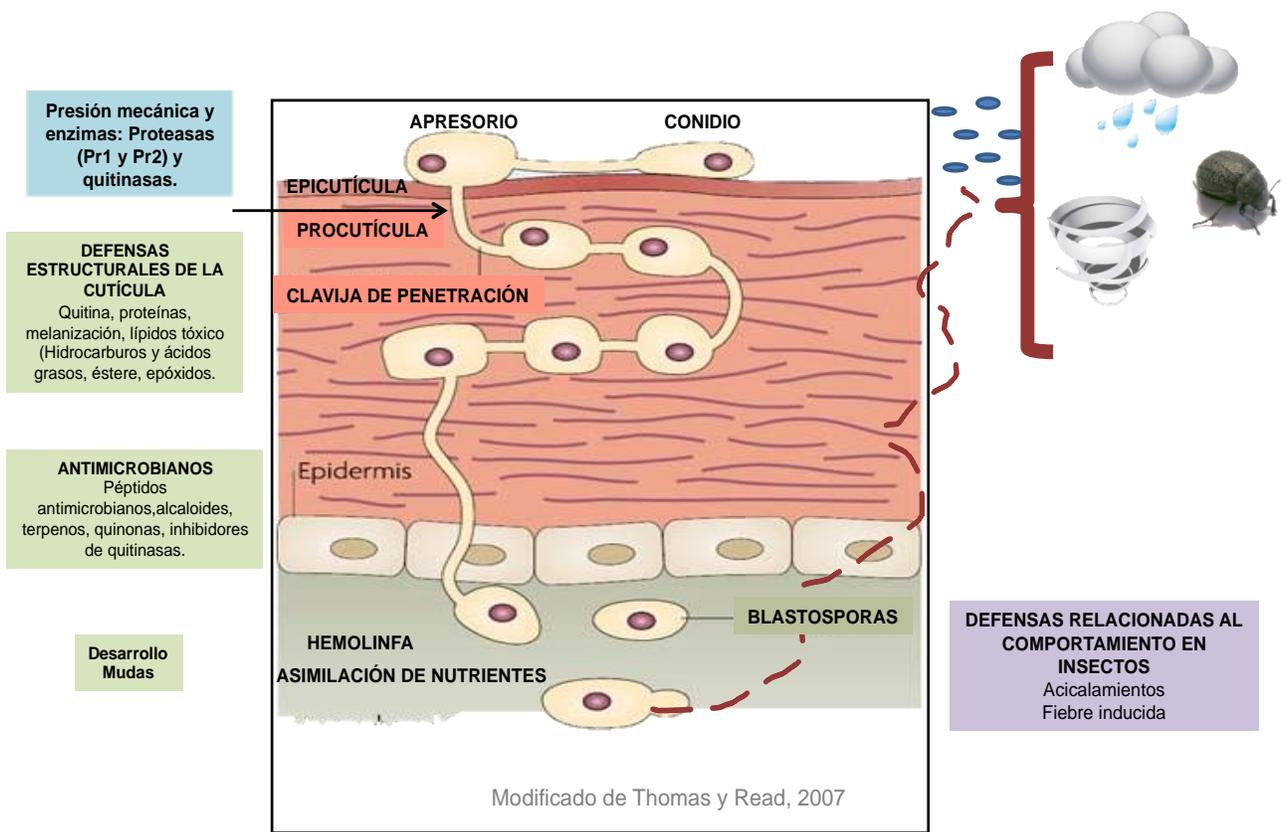


Fig. 4. Esquema general del mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos (modificado de Thomas y Read, 2007).

Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son pequeñas moléculas producidas por un organismo que no se requieren para sus procesos metabólicos primarios. Los hongos son fuente de diversos metabolitos secundarios, especialmente los ascomicetos. Muchos metabolitos secundarios no se encuentran involucrados en el crecimiento, desarrollo o reproducción del hongo en el cual se producen, pero juegan un papel importante en las interacciones ecológicas con otros organismos.

Se ha asumido que algunas de las funciones de estos compuestos se encuentran relacionadas a simbiosis con bacterias, hongos, amebas, plantas, insectos, entre otros,

actuando como defensa en contra de éstos, como transportadores de metales y como hormonas sexuales (Demain y Fang, 2000). Además, se ha relacionado a los metabolitos secundarios con la patogenicidad e incremento de virulencia de diversos hongos (Scharf et al. 2014). Muchos de estos tienen usos farmacéuticos (penicilina, cefalosporina, ergotrato y estatinas) y en la industria agroquímica.

Diferentes metabolitos han sido aislados de las especies de *Metarhizium* y las recientes secuencias genómicas de este género revelan una abundancia de vías biosintéticas y capacidad de producción de metabolitos secundarios como: destruxinas, serinociclinas, metaquelinas, ferricrocinas, dipéptidos y didepsipéptidos derivados de aminoácidos, fungerinas, poliquétidos y terpenoides (Donzelli y Krasnoff, 2016) con una amplia variedad de usos biomédicos relevantes. Como ejemplo, la destruxina B induce apoptosis en células de cáncer de pulmón, lo cual sugiere su uso como un tratamiento terapéutico (Wu et al. 2013). Por otro lado, una cepa de *M. anisopliae* tiene los mayores niveles de paclitaxel (un taxano usado en quimioterapia) (Donzelli y Krasnoff, 2016).

Algunos de estos compuestos en este género están relacionados a la virulencia y especificidad del hospedero (Amiri-Besheli et al. 2000). Los aislados de *Metarhizium* que producen grandes cantidades de destruxinas son los más virulentos (Sowjanya et al. 2008). Además, algunas destruxinas actúan como inmunomoduladores y suprimen la respuesta inmune del hospedero (Pal et al. 2007).

Comportamiento en el ambiente

Algo importante a evaluar en el uso de hongos entomopatógenos para el control biológico es su capacidad de persistir en el ambiente via transmisión horizontal entre el hospedero infectado y el sano (Roberts y Hayek, 1992). Una baja persistencia es deseable para reducir impactos ambientales negativos, mientras que una duración prolongada del producto puede garantizar una alta eficiencia (Zimmermann, 2007). Bajo condiciones naturales, la persistencia y movilidad de los conidios de *Metarhizium* se encuentra expuesta a un gran rango de factores bióticos y abióticos (temperatura, humedad, radiación solar, pH, microorganismos del suelo, plantas e invertebrados) (Lacey et al. 2015). La prevalencia y persistencia de este hongo se encuentra además afectada por especies de plantas agrícolas y prácticas de labranza (Jaronski, 2007). Los estudios de persistencia y viabilidad de *Metarhizium* en áreas agrícolas son muy escasos. En Puebla, Guerrero-Guerra et al. (2012) aplicaron *M. acridum* en cultivos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) para el control biológico de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). Los resultados mostraron que la viabilidad del hongo en el suelo fue de 66 semanas tras su aplicación, y las concentraciones de conidios en muestras de aire y vegetación decreció hasta su completa desaparición tras 8 meses después de haberlo aplicado.

En Australia, *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ahora *M. anisopliae*) y *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (ahora *M. lepidiotae*) fueron aplicados para el control de *Dermolepida albohirtum* (Coleoptera: Scarabaeidae) y *Lepidiota* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) en cultivos de caña de azúcar. Una pequeña porción de conidios sobrevivió por 3.5 años en todos los sitios y formulaciones usadas, sugiriendo que la lluvia y el tipo de suelo tienen efectos poco considerables sobre su persistencia (Milner et al. 2003).

Interacciones con hospederos

Los procesos que determinan las trayectorias evolutivas del hongo con la especificidad hacia el hospedero están muy estrechamente relacionados a los modos de acción de sus antagonistas naturales. La habilidad de los entomopatógenos para infectar insectos está usualmente restringida a un grupo particular de éstos. Se piensa que la variación de las formas anamorfas en la familia Clavicipitaceae ha surgido en respuesta a la presión selectiva asociada a la efectividad infectiva y de dispersión. El papel de conidios como gametos no ha sido detectado entre los parásitos de insectos y hongos pertenecientes a Clavicipitacea. En contraste con las ascosporas producidas y liberadas de un hospedero durante varios meses de un estroma de lento desarrollo, los rangos de los hospederos de los teleomorfos parecen ser generalmente mucho más estrechos (Boomsma et al. 2014).

Las etapas anamórficas de *Metarhizium* son a menudo generalistas que infectan una amplia gama de hospederos. El complejo *M. anisopliae* tiene registros de 204 especies de insectos infectados naturalmente, pertenecientes a siete órdenes distintos: Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Coleoptera (Zimmermann, 2007), mientras que otras especies o genotipos son más específicos para ciertos artrópodos. Por ejemplo *M. acridum* y *M. album* son especies específicas hacia ortópteros y hemípteros, respectivamente (Wang et al. 2012). Gao et al. (2011) realizaron un análisis comparativo de las secuencias genómicas de *M. anisopliae*, el cual posee un amplio espectro de hospederos, y de *M. acridum*, el cual es específico de acrídidos. El análisis del genoma total de estas dos especies indica que poseen una sintenia compartida. Además, sugieren que *M. acridum* a diferencia de *M. anisopliae* presenta mutaciones puntuales por duplicación en genes que codifican para las transposasas y el 16 % de los genes de *Metarhizium* son similares a genes

responsables de la patogenicidad en otros hongos, particularmente de patógenos de plantas. *M. anisopliae* posee una amplia familia de genes de proteasas, quitinasas, citocromo P450s, sintetasa peptídica no ribosomales para la degradación de la cutícula y biosíntesis de toxinas que han facilitado su capacidad de adaptarse a ambientes heterogéneos. Por otra parte, *M. acridum* transcribe distintas proteínas G con receptores acoplados a la cutícula de langostas y cucarachas, mientras que *M. anisopliae* transcribe el mismo receptor para ambos hospederos. Recientemente, se han reportado especies patógenas, raras pero con alta virulencia a camaleones (Squamata: Chamaeleonidae), como *M. viride* (antes *Chamaeleomyces viride*) y *M. granulomatis* (antes *Chamaeleomyces granulomatis*), las cuales han sido incluidas dentro del género *Metarhizium* (Kepler et al. 2014).

Los hongos y artrópodos han coevolucionado, teniendo complejas interacciones. Por su parte, los insectos han desarrollado defensas contra microorganismos que son ubicuos en los ambientes que habitan, como compuestos antimicrobianos en la cutícula, adaptaciones del comportamiento (fiebre inducida, acicalamiento, mudas) y como un último recurso del hospedero infectado, la respuesta inmune humoral (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013), como la producción de una proteína parecida al colágeno (MCL1) (Wang y St. Leger, 2006) y la actividad de la fenoloxidasas en la melanización ante patógenos externos (Sorrentino et al. 2002). En algunos casos ciertas especies de artrópodos muestran respuestas conductuales adaptativas para prevenir el contacto con inóculos de hongos patógenos. Los insectos sociales como la hormiga *Lasius japonicus* previene la dispersión de conidios de *M. anisopliae* en sus colonias mediante el acicalamiento (Okuno et al. 2012). Por otra parte, la langosta *Schistocerca gregaria* infectada con *M. acridum*, puede elevar su temperatura corporal por exposición solar y así eliminar al hongo (Blanford y Thomas, 1999).

***Metarhizium* como agente de control biológico en México**

Durante los últimos 40 a 50 años el combate de los insectos y ácaros que son plagas en la agricultura y medio rural se ha hecho principalmente utilizando insecticidas químicos, ocasionando daños a la salud, al medio ambiente, a organismos benéficos para la agricultura y provocando resistencia a ellos (SAGARPA, 2009). Una de las alternativas ante el uso de plaguicidas químicos es el control biológico, el cual puede ser definido como un componente del manejo integral de plagas para reducir sus poblaciones utilizando enemigos naturales (Van Lenteren, 2008). Debido al éxito que ha tenido el control biológico, más de 5000 introducciones de aproximadamente 2000 agentes de control biológico no nativos para control de plagas de artrópodos se han realizado en los últimos 120 años en 196 países (Bale et al. 2008).

En México, el uso del control biológico formalmente comenzó hace 75 años, cuando el Departamento de Agricultura de EUA y la Dirección de Defensa Agrícola de México llevaron a cabo un programa, para la introducción de *Aphelinus mali* (Hymenoptera: Aphelinidae) para controlar *Eriosoma lanigerum* (Hemiptera: Aphididae), la cual estaba afectando cultivos de manzanas en Coahuila (Barrera, 2007). Sin embargo, en el período entre 1900 y 1945 diversos reguladores naturales fueron introducidos a México para combatir la cochinilla de los cítricos (*Planococcus citri*), barrenadores de caña de azúcar (*Diatrea saccharalis* y *D. lineolata*), la almohadilla de algodón (*Icerya purchasi*) y la Catarina vedalia (*Rodolia cardinalis*) (Williams et al. 2013). Es hasta 1993 que el hongo entomopatógeno *Metarhizium* sp. comienza a ser usado para el control de *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae).

M. anisopliae es principalmente usado en zonas agrícolas en el Golfo de México y plantíos cercanos a costas del Pacífico para controlar la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae), la cual en su estadio ninfal se introduce en el suelo, adhiriéndose a las raíces de la caña, alimentándose de la savia inoculando enzimas aminolíticas y oxidantes provocando fitotoxemia (Byers y Wells, 1996). Al haber una sobrepoblación de estos insectos sobre la planta se presentan problemas de estrés hídrico, retrasando el crecimiento y por ende la producción de biomasa de la planta (Rodriguez, 2004). El daño que la mosca pinta causa a los cultivos de caña de azúcar disminuye considerablemente el rendimiento de azúcar por hectárea cultivada y se pierde el 30 % debido a diversas plagas (Leal et al. 1997). *M. acridum* ha sido aplicado para controlar especies de acrídidos (*Brachystola magna*, *B. mexicana*, *Melanoplus differentialis* y *S. purpurascens*) que afectan en gran medida cultivos de maíz, frijol, sorgo, soya y calabaza (Barrientos-Lozano y Almaguer-Sierra, 2009; SENASICA, 2012). *Metarhizium* spp. ha sido aplicado principalmente en sembradíos de agave, gramíneas (caña de azúcar y sorgo) y cultivos frutales (aguacate, papaya, melón) para control de *S. purpurascens*, *S. piceifrons*, *Phylophaga* sp., *Anomala* sp., *Copturus aguacatae*, *Heilipus lauri*, *Mythimna unipuncta*, *Aeneolamia postica*, *Prosapia simulans*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, *Cactophagus spinole*, *Frankliniella occidentalis*, *Thrips palmi*, etc (García de León y Mier, 2010). Diversos estudios han demostrado la efectividad de *M. anisopliae* en el control de artrópodos vectores de enfermedades de importancia médica como malaria (Scholte et al. 2006), dengue (Reyes-Villanueva et al. 2011; Garza-Hernández et al. 2013), enfermedad de Chagas (Vázquez-Martínez et al. 2009) y para controlar poblaciones de garrapatas que infestan el ganado (Alonso-Díaz et al. 2007; Fernández-Salas et al. 2016). Además, algunas especies del género *Metarhizium* han sido evaluadas solas o en combinación con dosis subletales de formulaciones químicas comerciales contra

cucarachas (Pachamuthu y Kamble, 2000), termitas (Ravindran et al. 2015) y moscas domésticas (Sharififard et al. 2011).

El CNRCB (Centro Nacional de Referencia de Control Biológico) cuenta con una colección de hongos entomopatógenos (CHE) con aproximadamente 200 aislados caracterizados como *Metarhizium* sp., con la finalidad de fomentar y mantener una colección de referencia para la generación de investigación científica y tecnológica a través de SENASICA.

Actualmente, existen numerosos productos cuyo ingrediente activo es *Metarhizium* spp. (Meta-Sin, Bio-Blast, Fitosan M) y aproximadamente 68 compañías producen masivamente cerca de 14 diferentes especies de hongos entomopatógenos (principalmente *B. bassiana* y *M. anisopliae*) para formulaciones de bioplaguicidas (García de León y Mier, 2010).

Los bioplaguicidas son productos biológicos basados en insectos entomófagos, hongos (entomopatógenos), bacterias, nematodos y virus, usados para el control biológico en agro cultivos. Más específicamente, los mico insecticidas son productos formulados con propágulos vivos de hongos entomopatógenos con la adición de un ingrediente inerte, una sustancia o adyuvantes que facilita su manejo, aplicación y efectividad (García de León y Mier, 2010). Existen diferentes tipos de formulaciones, como: polvo soluble, polvo humectable, granulados solubles y suspensiones acuosas. El método de aplicación, formulación y factores bióticos y abióticos del ambiente juegan un papel importante en la distribución espacial y persistencia de los propágulos fúngicos.

Un gran número de mico insecticidas y mico acaricidas han sido desarrollados a nivel mundial desde 1960. *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Isaria fumosorosea* y *B. brogniartii* son las especies más utilizadas como ingrediente activo en 171 productos comerciales, de los cuales 47 son basados en *Metarhizium* y se encuentran disponibles. La aplicación de bioplaguicidas tiene un mayor alcance, magnitud y cobertura cuando se realizan campañas fitosanitarias

conjuntamente realizadas por SAGARPA, el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y los gobiernos de cada estado.

Debido a los efectos negativos que muchos insecticidas químicos han presentado, es vital realizar diversas pruebas para otorgar el registro de un bioplaguicida antes de su liberación en el ambiente (Toriello, 2003). Diversos países y organizaciones internacionales, como la Organización Internacional de Control Biológico (IOCB), la Agencia de Protección Ambiental de EUA, entre otras, han promovido y desarrollado procedimientos para el registro de agentes microbianos usados como plaguicidas.

Siegel (1997) inició basado en la propuesta realizada en 1981 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el registro de bioinsecticidas, considerando los siguientes aspectos y pruebas: análisis del producto, residuos, toxicología efectos en organismos que no son el objetivo, destino, eficiencia y funcionalidad en el ambiente. En México, las instituciones que regulan los requerimientos, especificaciones y procedimientos para la importación y distribución de organismos utilizados en el control biológico son: SAGARPA, SENASICA y la DGSV. Actualmente, se cuenta con una regulación para el registro de bioplaguicidas regulada por la Secretaría de Salud, SAGARPA y la Secretaría de Comercio a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en la cual es requerida información como: identidad y composición del agente microbiano (nombre científico, ingredientes inertes), propiedades fisicoquímicas (color, pH), propiedades biológicas, información toxicológica (toxicidad dérmica y oral), ecotoxicología (efectos en flora y fauna terrestre y acuática), estudios de estabilidad (viabilidad del producto) (COFEPRIS, 2005). Diversas pruebas de bioseguridad concernientes a características toxicológicas, impacto al ambiente de este género y otros agentes microbianos se han realizado en México

(López-Martínez et al. 1978; Mier et al. 1989; 1994; 2005; Toriello et al. 1986, 2006, 2009; Brunner-Mendoza et al. 2017b).

Algunas cepas de *Metarhizium* nativas del país usadas en el control biológico han sido evaluadas para brindar información concerniente acerca de los riesgos a la salud. Aunque son escasos los estudios, se ha determinado ya la dosis letal media (DL50) en mamíferos (Toriello et al. 1999a), la patogenicidad y toxicidad de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ahora *M. anisopliae*) en un modelo murino (Toriello et al. 2006) y la evaluación de la exposición gástrica aguda con un micoinsecticida basado en *M. anisopliae* var. *acridum* (ahora *M. acridum*) (Toriello et al. 2009). Hasta ahora todos estos estudios han mostrado el bajo riesgo de cepas de *Metarhizium* en mamíferos, y aunque se ha sugerido potencial alergénico de estas especies no se han reportado casos en personal que aplica o produce este hongo (Zimmermann, 2007). Existen pocos reportes que atribuyen a este hongo como causante de enfermedades en humanos, como el caso de un paciente masculino de 18 años de edad de Colombia con una queratitis provocada por este hongo (De García et al. 1997) y un paciente masculino de 76 años de edad de Japón con un tratamiento sistémico esteroideo debido a artritis reumatoide crónica (Eguchi et al. 2015). Una posible infección diseminada en un niño de 9 años de edad con 5 años de leucemia linfoblástica aguda de células preB (Burgner et al. 1998) y dos casos de sinusitis, uno en un paciente masculino de 36 años de edad y otro en un paciente femenino de 79 años de edad, aparentemente inmunocompetentes (Revankar et al. 1999). En más de un siglo muy pocos casos relacionados a este género han sido reportados, lo que apoya el bajo riesgo a la salud humana que representa *Metarhizium* spp.



METODOLOGÍA

Aislados

Se utilizaron un total de 43 aislados polispóricos caracterizados inicialmente como *M. anisopliae* con base en su morfología, obtenidos de diferentes insectos hospederos, provenientes de diferentes colecciones, entre ellas la del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma de Morelos (Tabla 1). Además, se usaron cepas de referencia del género *Metarhizium* pertenecientes a las colecciones de la “Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization” (CSIRO) de Australia, y a la “Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi” (ARSEF), United States Department of Agriculture (USDA)” de Estados Unidos (Tabla 2). Los nombres de las especies del género *Metarhizium* corresponden a aquellos del trabajo de Kepler et al. (2014) y serán los utilizados en todo el trabajo.

Tabla 1. Aislados de *Metarhizium* de México

CÓDIGO UNAM	CÓDIGO CNRCB	Originalmente identificado como	HOSPEDERO	HÁBITAT	ORIGEN
EH-467/6	MaZC3A	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz
EH-468/1	MaGBA	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz
EH-469/6	MaGB3A	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz
EH-470/6	MaGB4	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz
EH-472/6	MaNP1	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	San Luis Potosí
EH-473/4	MaNL18	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	San Luis Potosí
EH-474/6	MaNL2	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	San Luis Potosí
EH-476/3	MaNM2	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	San Luis Potosí
EH-477/5	MaOPS1	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Oaxaca
EH-478/1	MaOPS2	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Oaxaca
EH-479/2	MaMV	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz
EH-480/8	MaZP	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz
EH-794/2	Ma103	<i>M. anisopliae</i>	Suelo	Campo experimental	Morelos
EH-795/1	Ma104M1	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Suelo	Morelos
EH-796/1	Ma106M1	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Suelo	Morelos
EH-797/1	Ma107M1	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Suelo	Morelos
EH-798/3	Ma108	<i>M. anisopliae</i>	Suelo	D	Morelos
EH-799/2	Ma109M2	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Suelo	Morelos
EH-801/3	Ma111	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Morelos
EH-802/1	Ma114	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	D	Morelos
EH-804/3	Ma246	<i>M. anisopliae</i>	D	D	D
EH-805/1	379	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	D	Colima
EH-807	HPI-003	<i>M. anisopliae</i>	D	D	D
EH-809/2	HPI-031	<i>M. anisopliae</i>	D	D	Morelos
EH-811/2	HPI-019/4	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	D	Morelos
EH-849/3	Ma01	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de caña de azúcar	Colima
EH-850/2	Ma02	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de caña de azúcar	Colima
EH-851/1	Ma03	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de maíz	Colima
EH-852/4	Ma04M2	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de maíz	Colima
EH-853/3	Ma05	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de soya	Tamaulipas
EH-857/3	Ma73	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Jalisco
EH-860/3	Ma76M3	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Jalisco
EH-861/3	Ma77	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Suelo	Colima
EH-862/3	Ma78M3	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Suelo	Jalisco
EH-863/1	Ma79	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Suelo	Jalisco
EH-865/5	Ma81	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Suelo	Jalisco
EH-866/5	Ma82	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Jalisco
EH-867/6	Ma83	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Jalisco
EH-868/2	Ma85M2	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	D	Guanajuato
EH-869/1	Ma91	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Suelo	Nayarit
EH-870/4	Ma95M4	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	D	Michoacán
EH-871/1	Ma96	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	D	Jalisco
EH-873/1	Ma117M1	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	D	D
EH-874/1	Ma377	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	D	Oaxaca

D=Desconocido; Suelo (obtenido con *G. mellonella*).

Tabla 2. Cepas de referencia del género *Metarhizium*

ESPECIE	CÓDIGO ARSEF* CÓDIGO CSIRO**	HOSPEDERO	ORIGEN
<i>M. acridum</i>	FI-985**	<i>Austracis guttulosa</i> (Orthoptera)	Australia
<i>M. acridum</i>	FI-987**	<i>Ornithacris cavroisi</i> (Orthoptera)	Nigeria
<i>M. album</i>	1941*	<i>Nephotettix virescens</i> (Homoptera)	Filipinas
<i>M. anisopliae</i>	7450*	<i>Heteronyx piceus</i> (Coleoptera)	Australia
<i>M. anisopliae</i>	FI-1029**	<i>Schistocerca gregaria</i> (Orthoptera)	Eritrea
<i>M. flavoviride</i>	1184*	<i>Otiarhynchus sulcatus</i> (Coleoptera)	Francia
<i>M. novaezealandicum</i> [^]	FI-698**	Lepidoptera	Nueva Zelanda
<i>M. f. var. pemphigum</i>	FI-72**	<i>Pemphigus treherni</i> (Homoptera)	Inglaterra
<i>M. flavoviride</i> Tipo E	2948*	Homoptera	Brasil
<i>M. lepidota</i> [^]	FI-147**	<i>Lepidota consobrina</i> (Coleoptera)	Australia
<i>M. majus</i> [^]	1914*	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	Filipinas
<i>M. minus</i> [^]	2037*	<i>Niliparvata lugens</i> (Homoptera)	Filipinas

*ARSEF= Agricultural Research Service of Entomopathogenic fungi, EEUU

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

Los nombres de las especies de *Metarhizium* corresponden a los asignados de acuerdo a la "USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures ARSEF", del catálogo de cepas recopiladas el 16 de Enero de 2014, excepto FI-72.

[^] Nombre de acuerdo a Kepler et al. (2014).

Obtención de aislados monospóricos

Para establecer una colección confiable que garantizara la autenticidad y pureza de cada aislado utilizado y para contar con una población genéticamente homogénea, se realizaron cultivos monospóricos de los 43 aislados *Metarhizium* de México y de las cepas de referencia *M. robertsii* (ARSEF 2575) y *M. pinghaense* (ARSEF 7929), usando la metodología descrita por Goettel e Inglis (1997), obteniendo una colonia de un solo conidio (Fig. 5). Fue considerado un solo aislado monospórico de cada polispórico. Éste fue seleccionado con base en su similitud al aislado polispórico original en cuanto a características principales, como dimensiones de los conidios y morfología de la colonia. La metodología fue realizada de la siguiente manera: Se obtuvo una suspensión de cada aislado cultivado en agar papa dextrosa (APD: 300 g/L papa blanca, 20 g/L dextrosa; Droguería Cosmopolita, México-, 15 g/L agar; Bioxon) a 28° C durante 8 días, usando Tween 20 al 0.5 % como surfactante. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas y se ajustó la suspensión conidial a 1×10^4 conidios/mL. Se depositaron 20 μ L de la suspensión por cada caja Petri con agar agua (15 g/L agar Bioxon), esparciendo con una espátula de vidrio. Usando un microscopio (Olympus) con el objetivo 40 X se examinó toda el área de la caja. Para delimitar el área a escindir, se cerró el diafragma del microscopio hasta observar un haz de luz que delimitara el área aproximada donde se encontraba un único conidio (2 mm² aprox.). Con un bisturí se trazó el área y se verificó nuevamente que solo se encontrara un conidio, todo lo anterior bajo condiciones de esterilidad. La fracción de agar delimitada fue colocada en una caja Petri con APD y se incubó a 28° C. Se realizó una revisión diaria de los cultivos monospóricos para constatar la aparición de una colonia a partir del conidio.

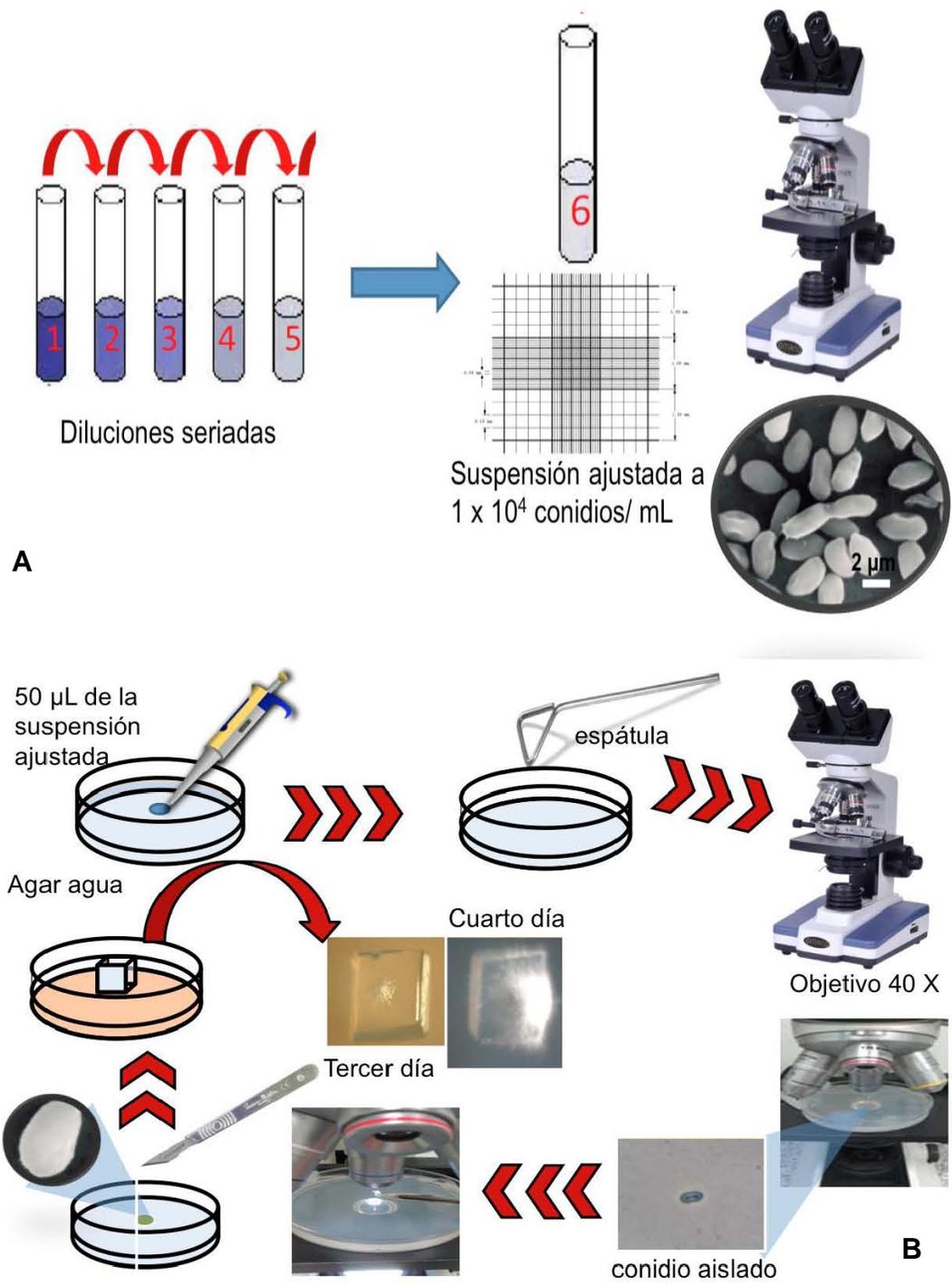


Fig. 5. A) Diagrama de la obtención del inóculo ajustado a una concentración de 1×10^4 conidios/mL B) Diagrama de la obtención de monospóricos.

Caracterización fenotípica

Macromorfología

Los aislados monospóricos de *Metarhizium* se sembraron en cajas Petri (100 x 15 mm) con medio Sabouraud con extracto de levadura SDYA [peptona de soya 1 % (Bioxon, México), glucosa 4 % (Droguería Cosmopolita), extracto de levadura 1 % (Universal Flavors; México), agar 1 % (Bioxon)] y medio APD (Anexo 1), se incubaron a 28 °C durante cinco días. Se determinaron las características morfológicas coloniales de cada cultivo como: color del anverso y reverso de la colonia, aspecto (liso, rugoso, polvoso), consistencia (dura, blanda, mucoide), superficie (plana, convexa, umbonada), además se determinó la tasa de crecimiento radial (diámetro de la colonia entre el tiempo). Para la determinación de la tasa de crecimiento, se colocó un círculo de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro en el centro de la caja Petri con medio SDYA y APD y se agregaron 2 µL de la suspensión conidial (2×10^5 conidios/mL) (Fig. 6). Se utilizaron cinco cajas de cada medio por aislado y se incubaron a 28° C. El crecimiento fue medido diariamente considerando dos diámetros perpendiculares de las colonias, determinando el crecimiento radial por el promedio de los diámetros menos el diámetro del papel filtro.

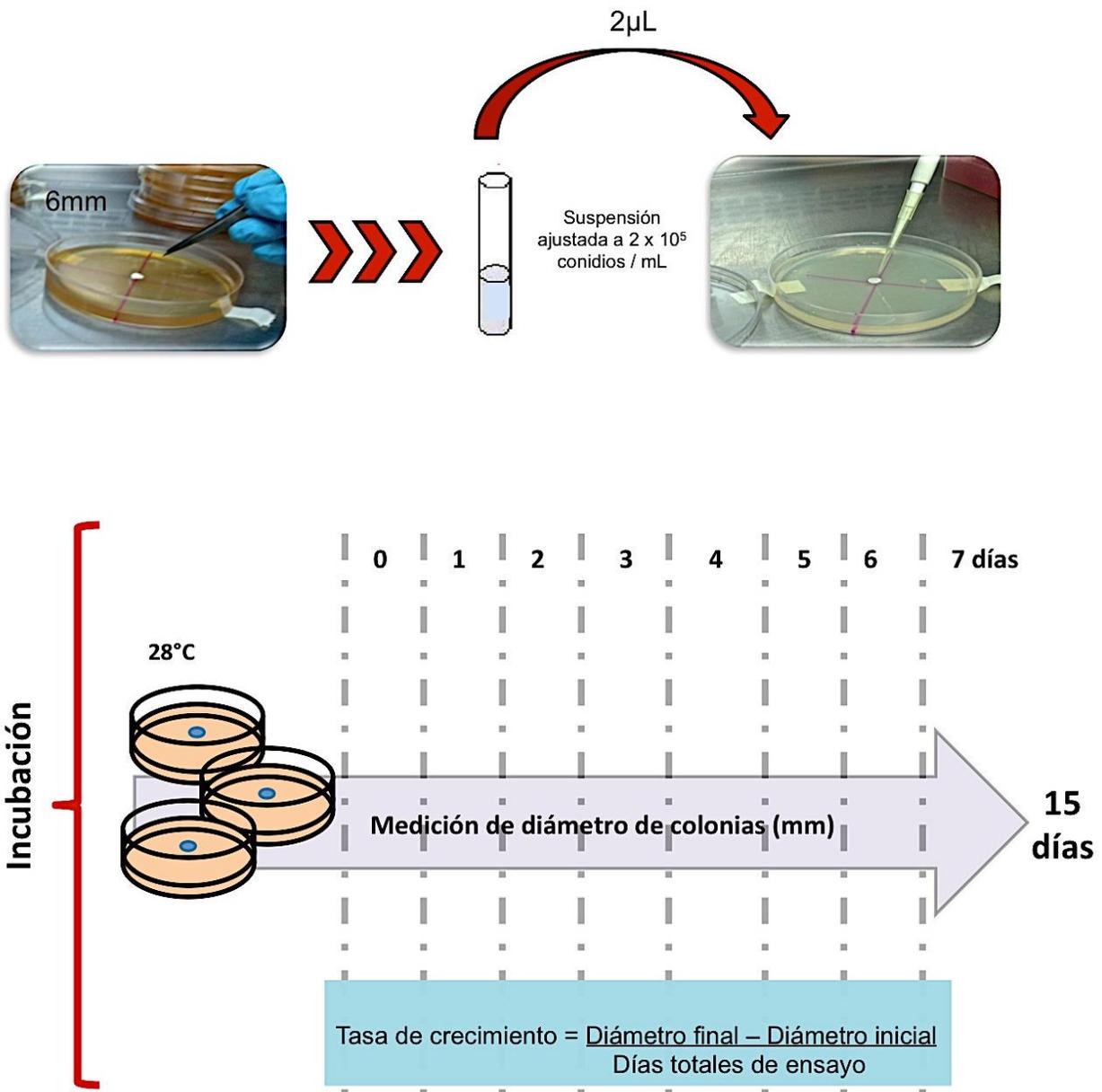


Fig. 6. Diagrama de experimentos para evaluación de la tasa de crecimiento y período de incubación de aislados monospóricos de *Metarhizium* de México.

El análisis de los promedios del crecimiento radial se realizó a los 17 días de incubación. Para la determinación de la variación en el crecimiento se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con los datos obtenidos a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. En casos donde se encontraron diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey HSD. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS versión 12.0.

Micromorfología

Las características micromorfológicas de los aislados estudiados se analizaron mediante la técnica de microcultivo (Ridell, 1950). Se cortaron asépticamente bloques de 1 cm² de APD, cada bloque fue colocado sobre un portaobjetos estéril, inoculando las cuatro aristas superiores con cada aislado estudiado. Se colocó un cubreobjetos estéril sobre el bloque de APD y se incubó dentro de una caja de Petri a 28° C durante 7 días. Para evitar la deshidratación del agar durante la incubación, se agregaron 3 mL de agua estéril dentro de las cajas Petri. Al concluir el periodo de incubación se separó con pinzas estériles el cubreobjetos del bloque de APD colocándolo sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón (Anexo 2) y se observó al microscopio, tomando en cuenta, las características morfológicas de los conidios (tamaño, color y forma), midiendo con un micrómetro ocular calibrado (Olympus), el largo y ancho de 30 conidios de cada aislado de *Metarhizium* (Fig. 7). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0.05$) para detectar diferencias significativas entre los aislados. Las imágenes de los conidios fueron registrados con una cámara digital (Infinity1 Cam, EUA).

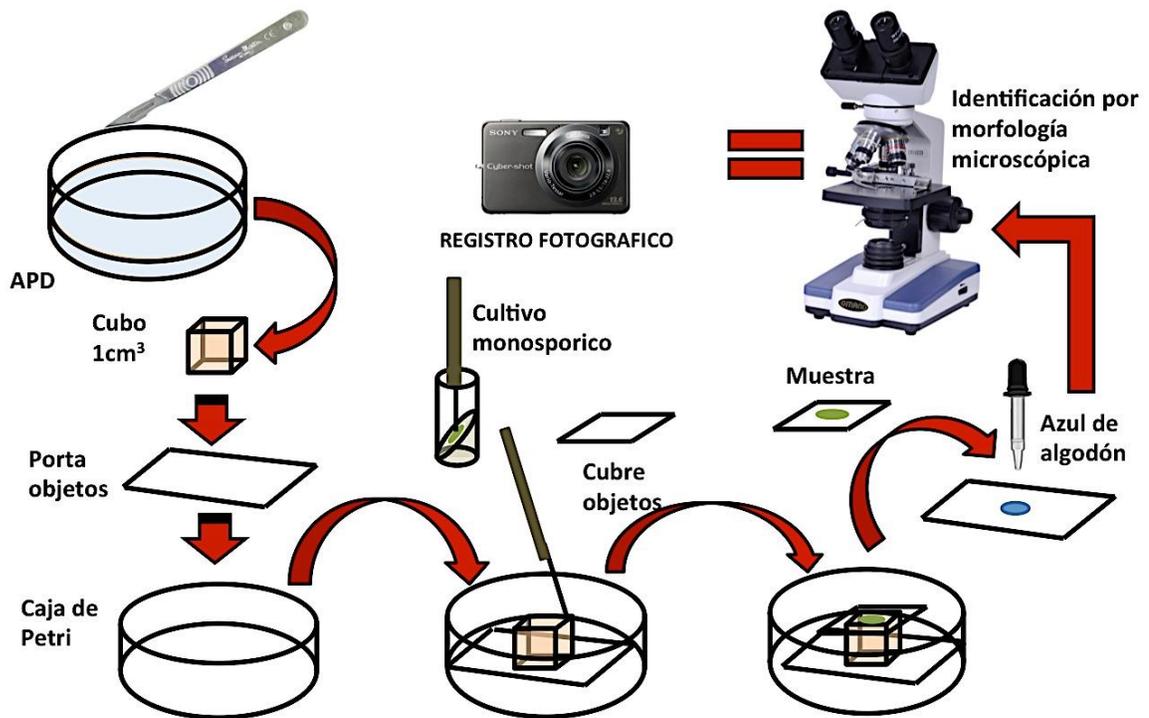


Fig. 7. Diagrama de la obtención de microcultivos de los aislados de *Metarhizium*.

Termotolerancia

Para la evaluación de los aislados a bajas temperaturas (8 y 15 °C), temperatura óptima (28 °C) y altas temperaturas (35 °C), se evaluó el crecimiento fúngico mediante espectrofotometría en una placa de 96 pozos. Se depositó en cada pozo 100 µL de APD (DIFCO, US), posteriormente cada pozo fue inoculado con 3 µL de una suspensión conidial (10^5 aprox.) en 0.01 % Triton X-100. El control negativo fue inoculado con 3 µL de agua destilada estéril.

El crecimiento fue considerado positivo a una absorbancia de 630 nm (A_{630}) >0.25 después de 14 días para las temperaturas de 8 y 15° C y de 5 días para las temperaturas de 28° y 35° C. Todos los ensayos se realizaron con una n = 8.

Bioensayos

Para evaluar la virulencia de los aislados utilizados en este estudio se usaron larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Massasauga Imports, ON, Canadá). Se aplicaron 10 μ L de suspensión conidial (10^5 conidios/mL) (10^3 conidios por larva) en la superficie del insecto. Los insectos fueron depositados individualmente en cajas Petri de 100 mm de diámetro con papel filtro impregnado con 400 μ L de agua destilada estéril. Estos fueron incubados a 25° C con fotoperiodos de 12/12 h luz/oscuridad y revisados diariamente para evaluar la mortalidad. Se utilizaron 10 insectos para cada aislado y 10 insectos como testigos negativos a los cuales solo se les aplicaron 10 μ L de agua destilada estéril (Fig. 8). La mortalidad fue registrada diariamente y los valores correspondientes al Tiempo Letal Medio (TL50) fueron calculados con un análisis Probit (PoloPlus 1.0).

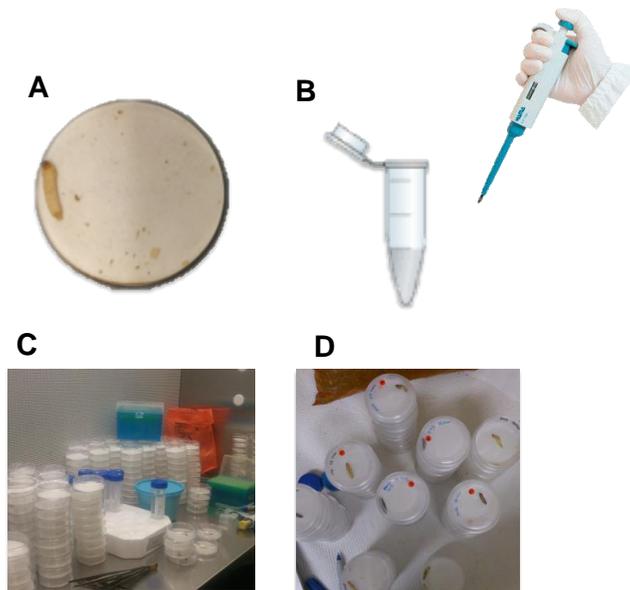


Fig. 8. Procedimiento para la evaluación de virulencia de los aislados de *Metarhizium* de México. (A) Testigo negativo (B) Inóculo (1×10^5 conidios/mL) (C) Deposición individual de larvas en cajas de Petri (D) Incubación a 28 °C y observación diaria de la mortalidad de las larvas.

Asociación con raíces de plantas

Para la evaluación de parámetro se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris*. Para prevenir cualquier crecimiento fúngico o bacteriano ajeno a los aislados utilizados en el experimento, las semillas fueron sumergidas en agua destilada estéril por 15 min en un matraz de 1000 mL, posteriormente se sumergieron tres veces en hipoclorito de sodio al 5 % por 2 min. Después de cada lavado con hipoclorito de sodio las semillas fueron enjuagadas con agua destilada estéril. Como lavado final se sumergieron en etanol al 70 % por 1 min y enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril para remover todo el etanol, y luego conservadas a 4° C para sincronizar su crecimiento.

Las semillas estériles fueron plantadas en sustrato estéril de vermiculita (Schultz Potting Mixture, Brantford, ON, Canada, esterilizada tres veces por autoclave a 121 °C por 1 h) y conservada a 25 °C con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad para su germinación. Para esta prueba, dos recipientes (cada uno con un volumen de 459 mL y previamente esterilizados por 20 min bajo luz UV) fueron utilizados para cada aislado. Ochenta gramos de vermiculita fueron depositados en los recipientes con cinco círculos (1 cm²) de colonias de los aislados de México con 14 días de crecimiento. Posteriormente, una capa de tierra estéril fue agregada cubriendo los círculos y transplantando cada plántula de siete días de crecimiento. Los testigos negativos contenían únicamente círculos de agar sin conidios y como testigo positivo se utilizó el aislado *M. robertsii* ARSEF2575, ya que en trabajos previos (Behie y Bidochka 2013) ha mostrado asociaciones endófitas con diversas especies de plantas en condiciones de laboratorio y en campo. Cada aislado y el testigo positivo y negativo fueron ensayados por duplicado. Se sembraron

muestras de tierra estéril en APD para monitorear cualquier contaminación fúngica antes y después de los experimentos.

Las plantas fueron monitoreadas regularmente y regadas con agua destilada estéril diariamente.

Las raíces de las plantas fueron extraídas a los 7 y 14 días posteriores a la inoculación.

La tierra fue removida y enjuagada de las raíces de las plantas hasta remover el exceso de tierra (aproximadamente 3 lavados en 100 mL de agua destilada estéril. Las raíces de cada planta fueron cortadas, pesadas y depositadas individualmente en tubos Falcon de 50 mL con 2.5 mL de agua destilada estéril y homogenizadas con un rotor (Greiner Scientific, EUA). Se inocularon por duplicado cajas Petri con medio selectivo Agar dextrosa peptona levadura (ADPL 2 g/L extracto de levadura, 10 g/L peptona, 20 g/L dextrosa, 15 g/L agar, 0.5 g/L cyclohexamida, 0.2 g/L cloranfenicol, 0.3 g/L al 98 % de pureza de dodina y 0.01 g/L de cristales violeta), inoculando 100, 200 y 400 mL de la raíz homogeneizada en las cajas Petri y se incubaron a 28 °C en oscuridad por 14 días. Los cultivos fueron revisados diariamente para realizar el registro de UFC (Unidades Formadoras de Colonias), las colonias fueron cuantificadas con base en las características morfológicas coloniales de *Metarhizium* (micelio blanco y conidios verde olivo) tras 7 y 14 días de incubación a 28 °C en oscuridad. La asociación con las raíces se consideró positiva cuando las UFC > 50. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado (Fig. 9). Como prueba estadística se realizó una T de Student para determinar las diferencias significativas entre las UFCs al día 7 y 14 con el programa StatPlus v12.0.

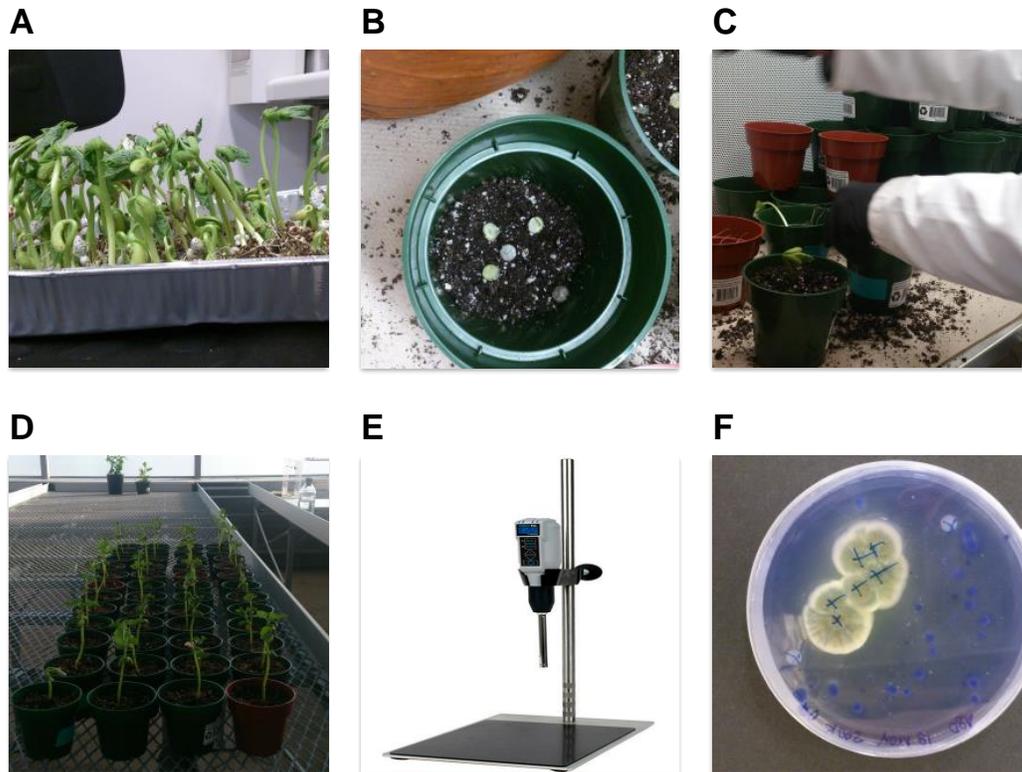


Fig. 9. Procedimiento para la evaluación de la asociación con raíces de plantas de los aislados de *Metarhizium* de México. A) Plántulas de *P. vulgaris* a los siete días de crecimiento en vermiculita; B) Inoculación de las cepas de *Metarhizium* en tierra estéril; C) Siembra de plántulas de siete días D) Crecimiento de plántulas en el invernadero E) Homogenizador F) Medio de cultivo selectivo para *Metarhizium*.

Extracción del ADN

Los aislados fueron mantenidos en APD y depositados en oscuridad a 4 °C. El ADN genómico se extrajo cultivando conidios de cada aislado en matraces de 125 mL con 50 mL de volumen con medio líquido de Levadura Peptona Glucosa (LPG 0.2 % extracto de levadura, 1 % peptona, 2 % de glucosa). Los matraces fueron agitados a 200 rpm a 27 °C por 3-4 días. La masa micelial fue colectada por filtración con una bomba de vacío con papel filtro P8 (Fisherbrand) y lavado con agua destilada estéril.

Aproximadamente 2 g del micelio fue congelado con nitrógeno líquido y triturado hasta obtener un polvo fino usando un mortero y pistilo de porcelana. El ADN genómico se extrajo usando el kit ADNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante.

Cuantificación de ADN

Para la cuantificación y determinación del cociente de pureza del ADN genómico se utilizó un espectrofotómetro DeNovix™ (Biotek, EUA), usando 2 µL siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. La cuantificación además fue corroborada contra un estándar de fago λ (Gibco BRL, EUA) por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñidos con bromuro de etidio. Posteriormente, el ADN de cada uno de los aislados de *Metarhizium* fueron diluidos para la obtención de una concentración final de ADN de 10-50 ng/µL.

Genotipificación por RAPD-PCR

Se utilizó el oligonucleótido universal derivado de regiones intergénicas T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCGAATCC) (De Oliveira et al. 2012; Thanos et al. 1996), empleando las condiciones de PCR descritas por Thanos et al. (1996) en un volumen final de reacción de 25 µL, usando amortiguador de PCR 1X, MgCl₂ a 2.5 mM, dNTPs a 200 µM (Applied Biosystems Inc, EUA), 10 pmoles/µL de cada oligonucleótido, 10 ng de ADN genómico y 1 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems). Se usó un testigo

negativo con todo lo anteriormente descrito con excepción de ADN genómico. La amplificación se realizó en un termociclador Esco swift[®] Maxi[™] Thermal Cycler Block (Esco Healthcare, Singapur) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 30 s, alineamiento a 54 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72° C durante 10 min.

Los patrones de bandas fueron analizados transformando los datos a una matriz de presencia/ausencia. El grado de similitud entre aislados fue evaluado mediante el coeficiente de Jaccard y el dendrograma fue generado con UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). La reproducibilidad de los patrones generados se garantizó por réplicas independientes usando un rango de concentraciones de ADN. Los perfiles de bandas fueron correlacionados con los datos proporcionados por las secuencias ITS.

Amplificación por PCR

Subtilisina Pr1

Para la amplificación del gen que codifica para Pr1 se utilizaron los oligonucleótidos diseñados de la secuencia de Pr1 cADN METPR1: 5´CAC TCT TCT CCC AGC CGT TC; METPR2: 5´AGG TAG GCA GCC AGA CCG GC; METPR4: 5´ GTA GCT CAA CTT CTG CAC TC; METPR5: 5´TGC CAC TAT TGG CCG GCG CG (St. Leger et al. 1992).

La amplificación del fragmento del gen Pr1 fue realizado por PCR anidada. Para la primera PCR se utilizaron los oligonucleótidos externos (METPR1 y METPR4). La segunda PCR utilizó 5 µL del producto de PCR de la primera y los oligonucleótidos

(METPR2 y METPR5). La PCR fue realizada en un termociclador BioRad usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94° C durante 4 min, 37 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 min, alineamiento a 58° C durante 1 min, extensión a 72° C durante 2 min y una extensión final a 72° C durante 6 min. El volumen de la reacción fue de 25 µL, el cual consistía de: 10 mMol Tris-HCL pH 8.8, 50 mMol KCl, 1.5 mMol MgCl₂, 0.1 % Triton X-100, 50 ng de cada oligonucleótido, 200 µMol de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 0.4 unidades de ADN polimerasa y 1 µL de ADN. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en agar al 1.5 % en buffer TBE al 0.5 % (Anexo 3) con bromuro de etidio.

Espaciador Interno Transcrito ITS1 e ITS2

Para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 se utilizaron los oligonucleótidos TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Sigma) que amplifican un fragmento de 601 pb (Fig. 10), previamente probados por Curran et al. (1994), y Driver et al. (2000).

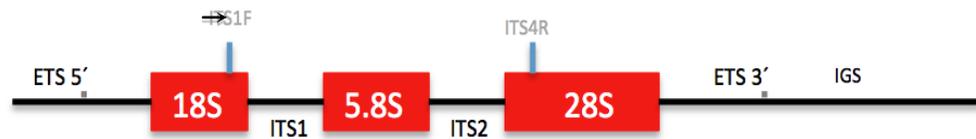


Fig. 10. Esquema de la región correspondiente al rARN. El rARN es un elemento fundamental en el mecanismo de la traducción, ya que esta clase de ARN son elementos constitutivos y conformacionales de los ribosomas. Todas las células eucariontes contienen rARN 28S, 18S, 5.8S y 5S. El transcrito primario en eucariontes tiene una longitud aproximada de 13 kb. Está constituido por una región 5' que se identifica como espaciador transcrito externo (ETS5', representado por una línea negra) y se encuentra junto a la región genómica que codifica para el rARN 18S (rectángulo rojo); inmediato a éste, se encuentra el sitio denominado espaciador transcrito interno 1 (ITS1, representado por una línea negra); la región correspondiente al 5.8S (rectángulo rojo), seguido del ITS2, el sitio de la región del rARN 28S (rectángulo rojo) y una región ETS3'; por último, está la región IGS, *intergenic region*, es una región de la secuencia de ADN localizada entre genes, siendo un subconjunto de ADN no codificante, que ocasionalmente actúan como control de genes cercanos (Jiménez y Merchant, 2003). Los oligonucleótidos ITS1F e ITS4R son aquellos reportados por Driver et al. (2000).

Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo de acuerdo a lo reportado por Curran et al. (1994) en un volumen final de reacción de 25 μ L. Se emplearon: amortiguador de PCR 1X, 2.5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 100 pmol/ μ L de cada oligonucleótido AB28 y TW81, 10 ng de ADN genómico y 1 U *Taq* polimerasa (Applied Biosystems). La amplificación se realizó en un termociclador iCycler™ (Bio-Rad, Hercules, CA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, alineamiento a 58 °C durante 30 s, extensión a 68 °C durante 30 s y una extensión final a 68 °C durante 2 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con GelRed, en amortiguador TBE 0.5 X (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) (Curran et al. 1994).

Factor de Elongación TEF

Para la amplificación y secuenciación de la región 5'-TEF (Fig. 11) los oligonucleótidos utilizados fueron: EF1T (5-ATGGGTAAGGARGACAAGAC) y EF2T (5-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (Rehner y Buckley 2005). Se utilizó un volumen final de reacción de 25 μ L, con amortiguador de PCR 1X, $MgCl_2$ a 1.5 mM, dNTPs a 200 μ M (Applied Biosystems Inc, EUA), 50 μ M/ μ L de cada oligonucleótido, 20 ng de ADN genómico y 1 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems). Además, se incluyó un testigo negativo con todo lo anteriormente descrito excepto por ADN genómico.

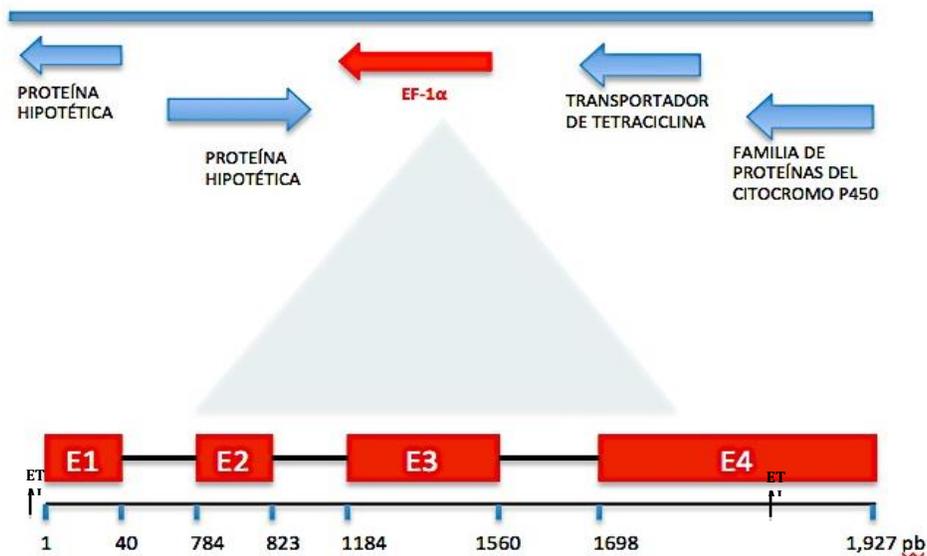


Fig.11. Esquema de la región que codifica para TEF de *M. anisopliae* (ARSEF 23). Este factor (TEF), es una proteína ubicua, altamente conservada involucrada en la traducción. La función principal de la subunidad α y $\beta\gamma$ es mediar la entrada del aminoacil tARN al sitio libre del ribosoma. Una única copia del TEF usualmente está presente en el genoma de hongos, excluyendo algunos hongos que presentan un gen parecido a TEF (James et al. 2006). El TEF en *M. anisopliae* tiene una longitud de 1,927 pb, presentando cuatro exones (rectángulos rojos: E1, E2, E3 y E4) y tres intrones (líneas negras). En las regiones adyacentes se encuentran proteínas hipotéticas y el gen que codifica para un transportador de tetraciclina (flechas azules)(GenBank, 2014). Los oligonucleótidos EFF y EFR utilizados para la amplificación de este fragmento por PCR en el género *Metarhizium* son los reportados por Bischoff et al. (2006).

La amplificación se realizó en un termociclador BioRad T100 usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94° C durante 2 min, 36 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 min, alineamiento a 66° C durante 30 s disminuyendo 1 °C en cada ciclo hasta llegar a 58 °C, extensión a 72° C durante 1 min y una extensión final a 72° C durante 10 min. La amplificación se realizó por la técnica de disminución gradual de temperatura de alineamiento “Touchdown PCR” (Don et al. 1991), en un termociclador BioRad T100.

Regiones Intergénicas IGS

La amplificación de las regiones intergénicas (IGS) de los aislados de *M. anisopliae* de México se realizó con los oligonucleótidos MzIGS3_1F (5'CGTGGCTCCTGACCATGGTTGC) y MzIGS3_4R (5'GCGGGGGAGCCGACTTGGGA) siguiendo las condiciones de PCR descritas por Rehner y Kepler (2013) en un volumen final de reacción de 25 µL, usando amortiguador de PCR 1X, MgCl₂ a 1.5 mM, dNTPs a 200 µM (Applied Biosystems), 100 pmoles/µL del oligonucleótido, 10 ng de ADN genómico y 1 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems). Además, se incluyó un testigo negativo con todo lo anteriormente descrito excepto ADN genómico. La amplificación se realizó en un termociclador BioRad usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 61 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 80 s y una extensión final a 72 °C durante 15 s. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con GelRed (10 µg/mL) en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Base a 45 mM, ácido bórico a 45 mM, EDTA a 1 mM).

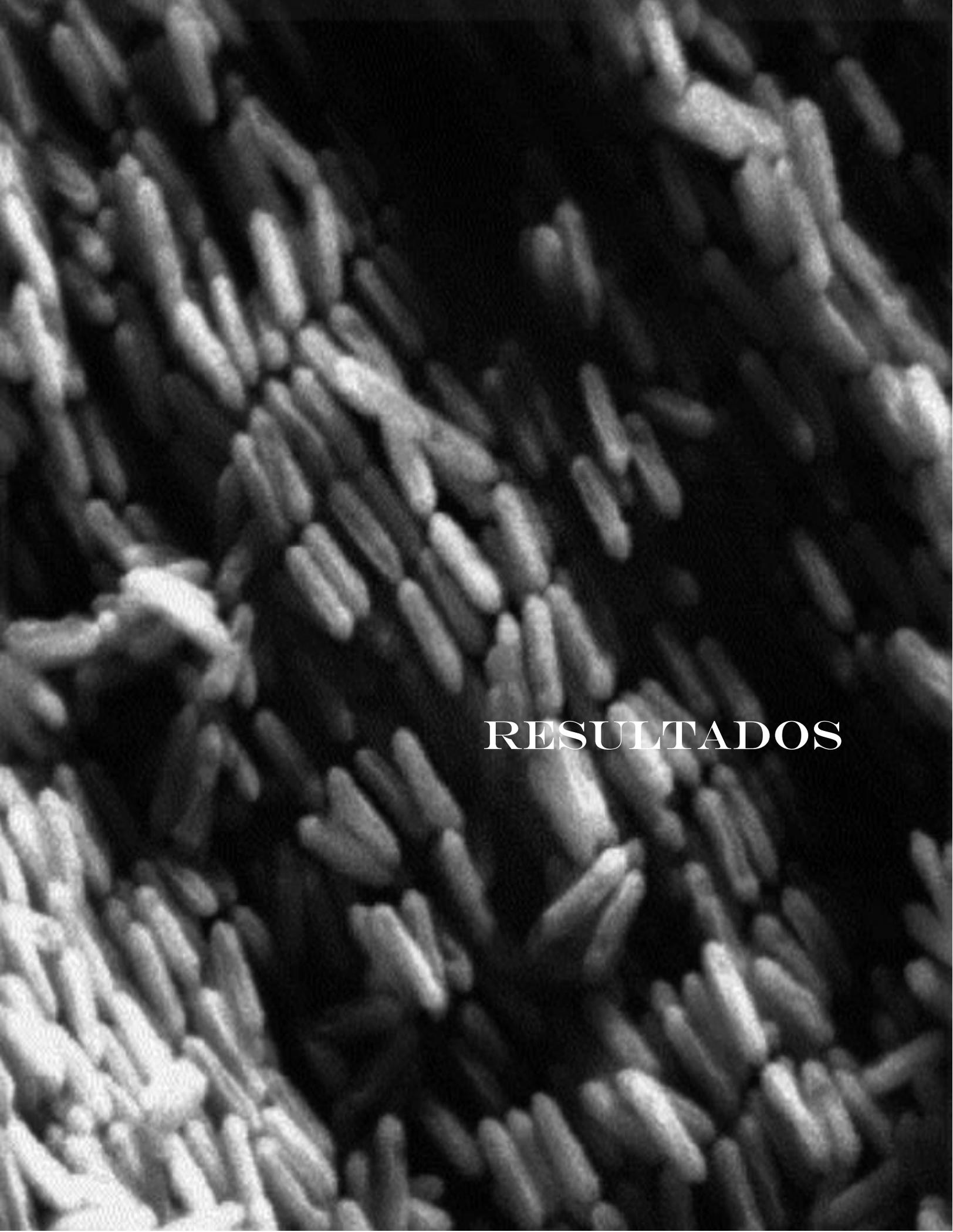
Para la amplificación de las regiones ITS, IGS y TEF fue necesario estandarizar algunos parámetros realizando curvas para determinar la concentración óptima de ADN (5, 10, 20, 30 ng/μL), oligonucleótidos (25, 50 100, 200 y 300 pM) y MgCl₂ (1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con GelRed (10 μg/mL) en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM). Aquellos productos de PCR que presentaron una banda del tamaño molecular esperado (EF1α = 600; ITS = 600; IGS = 1200 pb) y sin presencia de bandas inespecíficas fueron enviados a secuenciar en ambos sentidos a High Throughput Genomic Center, Seattle, Washington.

Análisis de polimorfismos por RFLP

Para evaluar los polimorfismos dentro de los aislados de este estudio se utilizaron los productos de PCR de Pr1 y de TEF. Para los amplicones de Pr1 se adicionó la endonucleasa *RsaI*, previamente utilizada para identificar asociación en la rizosfera de plantas y especies de *Metarhizium* (Wyrebek et al. 2011), mientras que para los productos de PCR de TEF se adicionaron las endonucleasas *MseI* y *XhoI*, elegidas debido a sus polimorfismos que han sido útiles para identificar especies dentro del complejo *M. anisopliae*. La digestión se realizó utilizando 5 μL de producto de PCR de Pr1, 5 unidades de enzima *RsaI* (0.5 μL), 1 μL de buffer 10 X y 13.5 μL de agua libre de nucleasas. Las reacciones fueron incubadas a 37° C por 6 h. Tras la digestión los productos fueron analizados por electroforesis en agarosa al 2 % en buffer TBE al 0.5 % con bromuro de etidio.

Análisis de datos moleculares

Se llevó a cabo una búsqueda *in silico* en la base de datos de nucleótidos del GenBank® con el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando las secuencias ITS, IGS y TEF de los aislados de *Metarhizium* de México de diversos hospederos y estados de la República. Se incluyeron al análisis las secuencias ITS reportadas por Driver et al. (2000), las secuencias IGS reportadas por Rehner y Kepler (2013) y las secuencias TEF reportadas por Bischoff et al. (2009) correspondientes a un taxón representativo de cada clado. Los electroferogramas se analizaron y las secuencias se editaron con el programa Geneious R8.1.5. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MAFFT v7.017 (Kato y Kuma, 2002). La selección de modelos de sustitución de nucleótidos se realizó con el programa Jmodeltest con un criterio de Akaike (AIC), seleccionando un modelo de sustitución GTR con una tasa de variación Gamma. La hipótesis filogenética se desarrolló por Inferencia Bayesiana (IB) con MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), con los siguientes ajustes: una longitud de cadena = 1,100,000; frecuencia de submuestreo = 200; cadenas calientes = 4; temperatura de las cadenas = 0.2. Los filogramas mostrados en este trabajo, son el árbol consenso con las longitudes de ramas de los análisis bayesianos. Todas las construcciones filogenéticas fueron realizadas con el programa Geneious 8.1.8.



RESULTADOS

Aislados y obtención de monospóricos

Se recopilaron 43 aislados de *Metarhizium* de distintas regiones de México, obtenidos del CNRCB y de la UAEM a partir de diversos hospederos. Además, se realizaron cultivos monospóricos de todos los aislados de México y de los aislados de *M. robertsii* (ARSEF 2575) y *M. pinghaense* (ARSEF 7929). Los cultivos monospóricos obtenidos fueron conservados en glicerol al 10 % y fueron depositados en la Colección de Hongos del Laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM y registrados en la “World Federal Culture Collection” como BMFM-UNAM834 (Fig. 12) (Tabla 1 y 2).

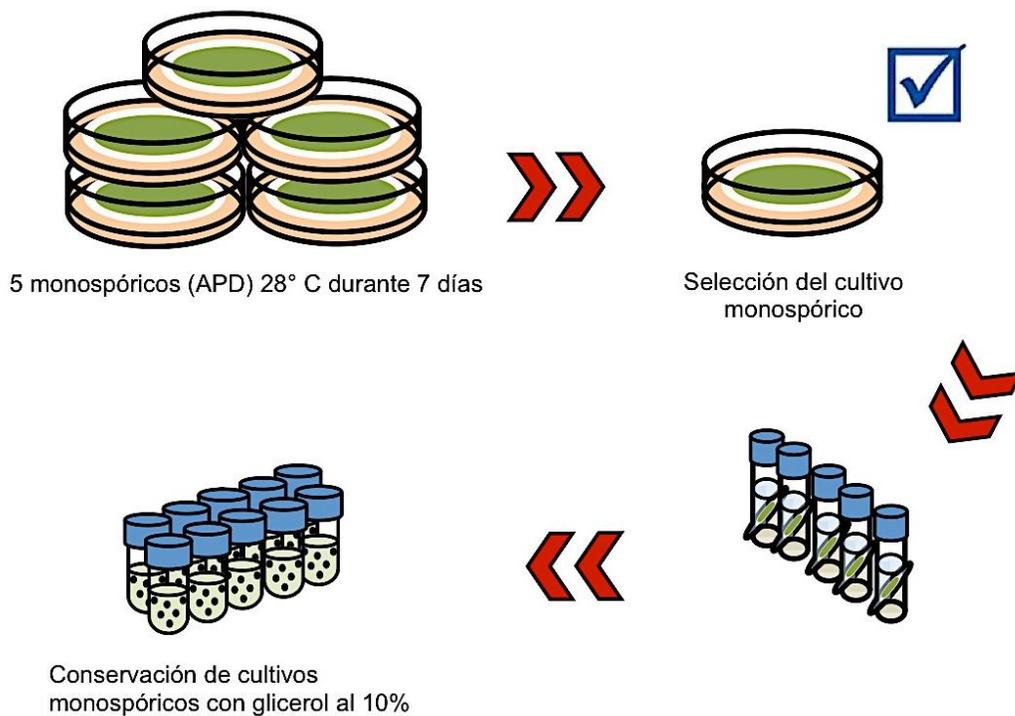


Fig.12. Diagrama de la obtención de monospóricos y conservación en glicerol al 10%.

Caracterización fenotípica

Macromorfología

La mayoría de aislados monospóricos obtenidos presentaron las características típicas de la especie: colonias con micelio blanco a blanco amarillento, simétricas, de aspecto algodonoso, que al esporular presentaban tonalidades verde olivo, y que alcanzaron un diámetro de hasta 32 mm en SDYA y 29 mm en APD a los 10 días a 28 ° C (Fig. 14) (Anexo 4). Sin embargo, algunos aislados como: EH-795/1, EH-797/1, EH-802/1, entre otros, mostraron una morfología atípica (tonalidades anaranjadas a marrones, baja o nula esporulación, regiones sectorizadas, relieves, etc.) (Fig. 13).



Fig. 13. Aislados con morfología atípica. 1 y 2= EH-795/1 en medio SDAY y APD respectivamente y 3 y 4= EH-804/3 en medio SDAY y APD respectivamente.

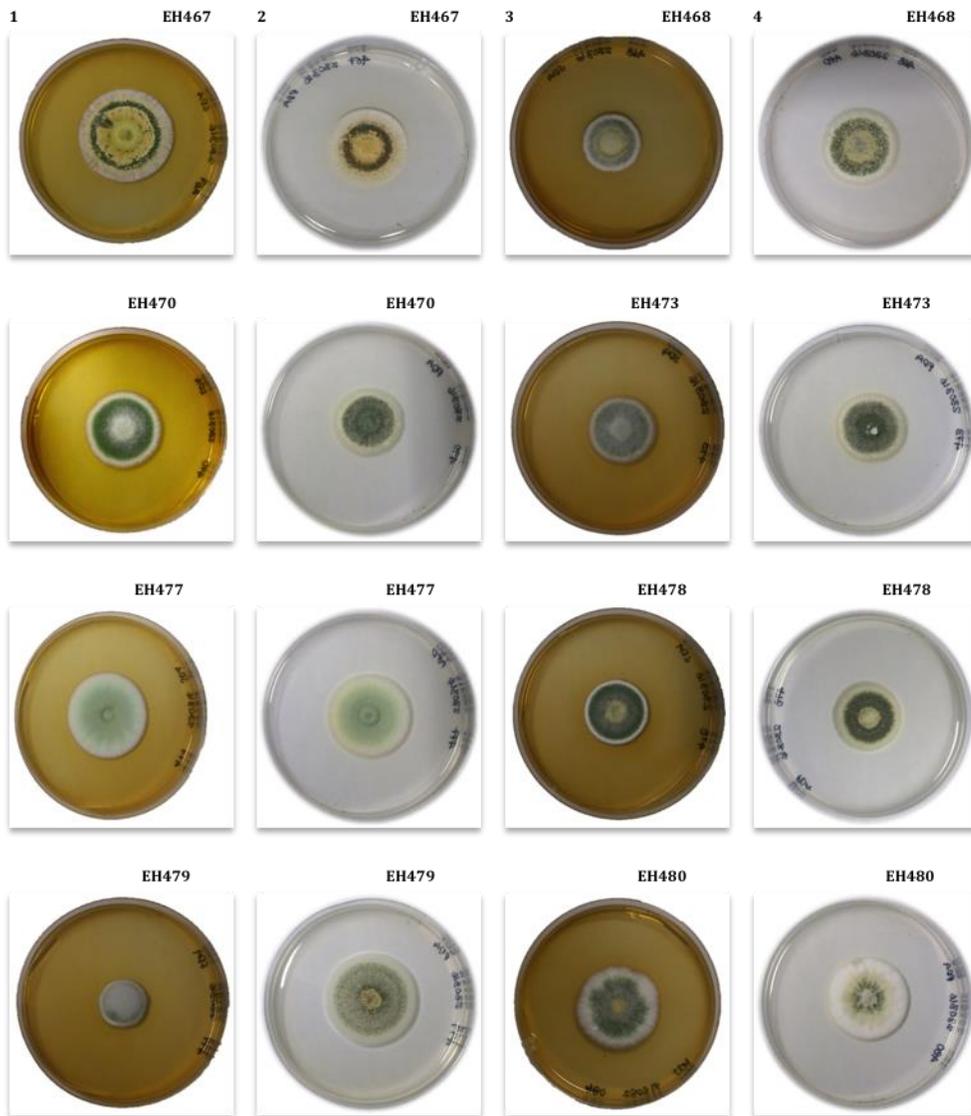


Fig. 14. Aislados de *Metahizium* de México en medio SDAY (columna 1 y 3) y APD (columna 2 y 4).

Crecimiento radial

Los aislados monospóricos presentaron diferencias significativas en su tasa de crecimiento ($F = 402.551$; g.l. 24, 100; $p = 0.001$) (Anexo 5), siendo el aislado EH-473/4 el que presentó el mayor crecimiento (4.35 mm/día) y el aislado EH-800/1 el de menor crecimiento (1.62 mm/día) (Fig. 15).

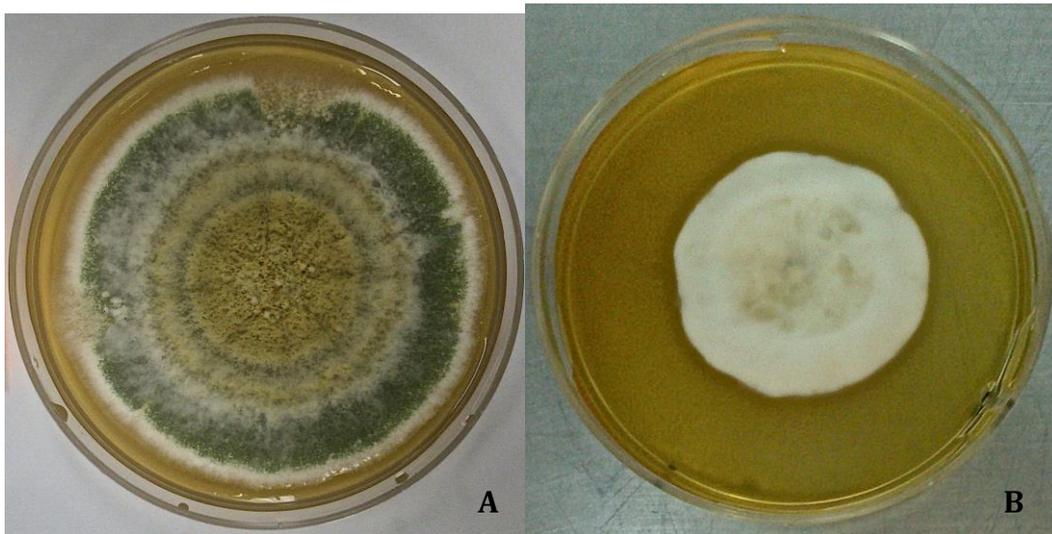


Fig. 15. Tasa de crecimiento en SDAY a 28 °C de los aislados de *Metarhizium* de México. A) Aislado que presentó la máxima tasa de crecimiento (EH-473/4) y B) Aislado con la mínima tasa de crecimiento (EH-800/1).

Micromorfología

Los hallazgos por microscopía mostraron la morfología típica descrita para *M. anisopliae* para todos los aislados usados en este estudio (conidios basípetos y catenulados con forma elipsoidal y cilíndrica, conidióforos simples y ramificados de longitud variable, hifas septadas, ramificadas y hialinas) (Fig. 16). No se evidenciaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los aislados de referencia de *M. robertsii* (ARSEF 2575), *M. pinghaense* (ARSEF 7929) y los aislados de México en cuanto a las dimensiones de los conidios, siendo éstas entre 7.0 a 8.2 x 2.54 a 2.7 μm .

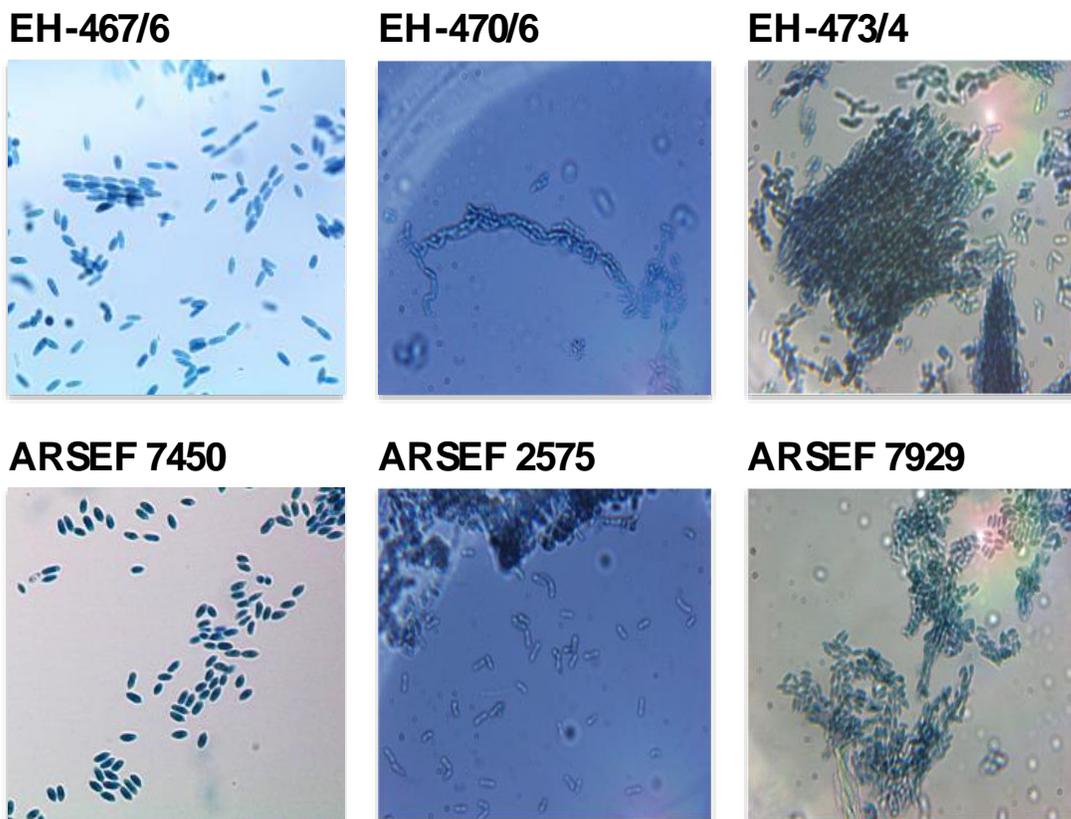


Fig. 16. Micromorfología de los aislados EH-467/6, EH-470/6, EH-473/4, *M. anisopliae* (ARSEF 7450), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *M. pinghaense* (ARSEF 7929).

Termotolerancia

Los ensayos de los perfiles de termotolerancia de los aislados de México mostraron un crecimiento óptimo a 28 °C (Fig. 17, Anexo 6), siendo los aislados EH-798/3, EH-805/1, EH-807, EH-811/2, EH-861/3; EH-866/5 y EH-867/6 los de mayor crecimiento. Ninguno de los aislados sobrepaso el nivel de $A_{630} > 0.25$ a 8 °C, sugiriendo que dentro de los aislados estudiados ninguno presenta tolerancia a bajas temperaturas. A 35 °C la mayoría de aislados crecieron de forma limitada, excepto los aislados EH-802/1, EH-807, EH-861/3 y EH-874, los cuales no sobrepasaron el umbral de $A_{630} > 0.25$ a esta temperatura. El testigo negativo no mostró crecimiento de ningún tipo en todas las temperaturas ensayadas (valores de $A_{630} = 0.00$).

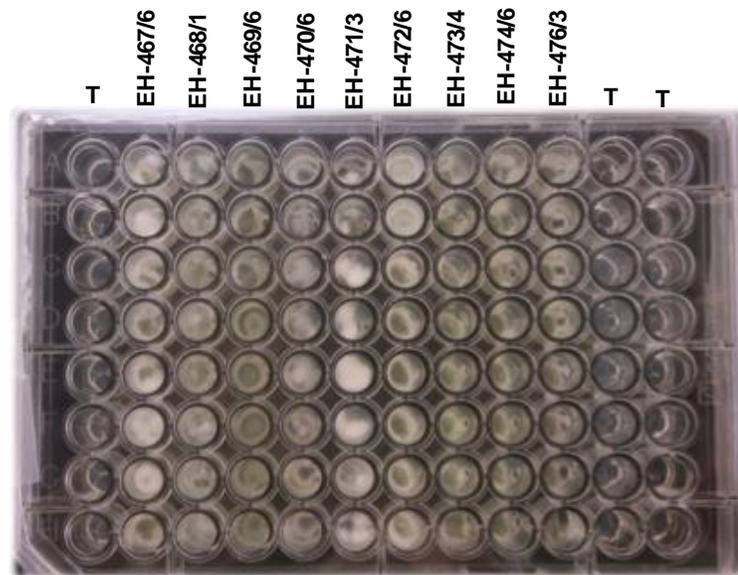


Fig. 17. Placa de 96 pozos con medio APD con 3 μ L de una suspensión conidial (10^5 aprox.) de aislados de *Metarhizium* de México al cuarto día de crecimiento a 28 °C. T= Testigo negativo (APD con 3 μ L de agua destilada estéril).

Bioensayos

Los bioensayos llevados a cabo utilizando *G. mellonella* mostraron diversos patrones de virulencia entre los aislados (Figs. 18 y 19), con un promedio de 2.5 días de TL50 (Anexo 6), siendo el aislado más virulento el EH-809/2 ($1.5 \text{ d} \pm 1.40 - 1.68$) y el EH-478/1 ($4.4 \text{ d} \pm 3.84 - 4.94$) el menos virulento. Los testigos negativos no mostraron signos de infección fúngica o mortalidad durante el periodo del bioensayo.

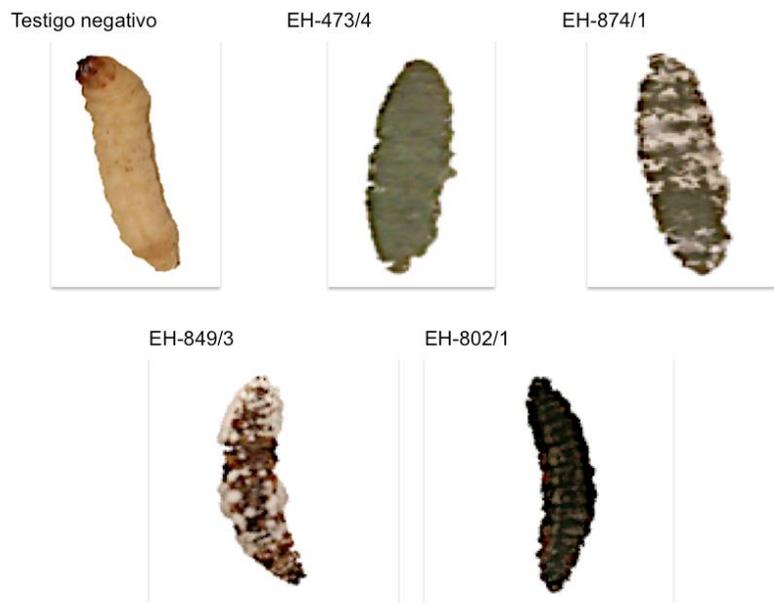


Fig. 18. Larvas de *G. mellonella* infectadas con aislados de *Metarhizium* de México ocho días después de la infección.

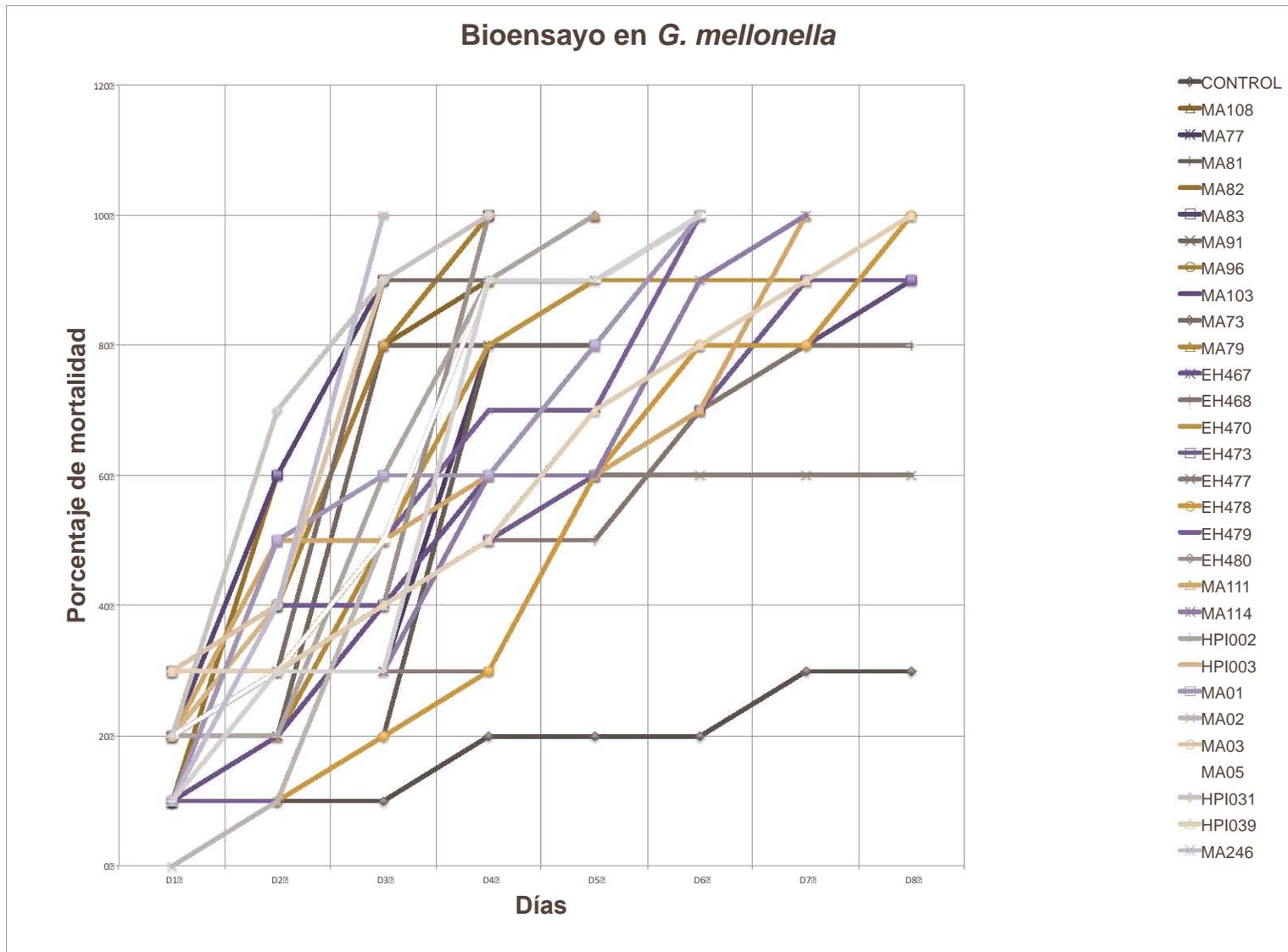


Fig. 19. Ejemplo de los TL50 de algunos aislados de *Metarhizium* de México durante 8 días (Porcentaje de mortalidad/días).

Asociación con raíces de plantas

Los resultados de la asociación de los aislados estudiados con raíces de *P. vulgaris* mostraron diferencias estadísticamente significativas al día 7 y 14 ($p = 0.0007$). El testigo positivo (ARSEF 2575) mostró un promedio de 9.5 UFC/g de raíz al día siete y 195 UFC/g de raíz al día 14. La mayoría de los aislados ($n = 21$) mostraron > 50 UFC/g de raíz al día siete, mientras que al día 14 solo dos aislados (EH-805/1 y EH-473/4) mostraron incremento de UFC (Anexo 6). A pesar de esto, *Metarhizium* fue recuperado de todas las cajas Petri inoculadas con raíz homogenizada en medio selectivo. No se observó crecimiento fúngico en los controles negativos.

Cuantificación de ADN

Se obtuvo el ADN de 43 cultivos monospóricos de *Metarhizium* de México y 8 cepas de referencia de diversas especies del género *Metarhizium*. La concentración, calidad y pureza fue determinada por electroforesis (Fig. 20) y por espectrofotometría. El ADN obtenido de los aislados tuvo una concentración de 5-200 ng/ μ L y un cociente A_{260}/A_{280} (el cual proporciona una estimación del grado de pureza), con valores de 1.6 a 2.0 en los diversos aislados.

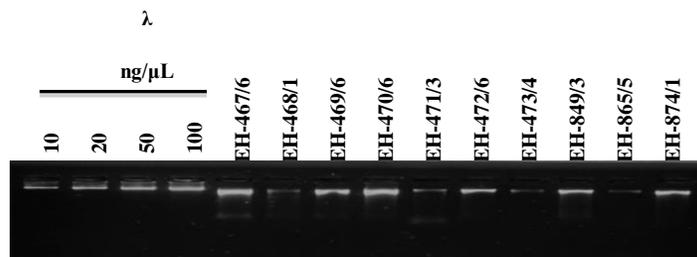


Fig. 20. Cuantificación del ADN de aislados de *Metarhizium* de México. Curva de fago λ de 10 a 100 ng. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.8 % a 100 V, 60 min, con GelRed.

Genotipificación por RAPD-PCR

La amplificación usando el oligonucleótido universal T3B se llevó a cabo utilizando el ADN de los 43 aislados monospóricos de *Metarhizium* de México y otras cepas de referencia del mismo género (*M. acridum* FI-985, *M. robertsii* ARSEF 2575 y *M. pinghaense* ARSEF 7929). Esta prueba mostró patrones de bandas desde 100 hasta los 1400 pb (Fig. 21). El dendrograma derivado del análisis de los perfiles de todos los aislados con las condiciones usadas generó agrupaciones que no discriminaban entre especies del género *Metarhizium*, por lo que este marcador no se consideró informativo para la delimitación de especies cercanas en este género (Fig. 22).

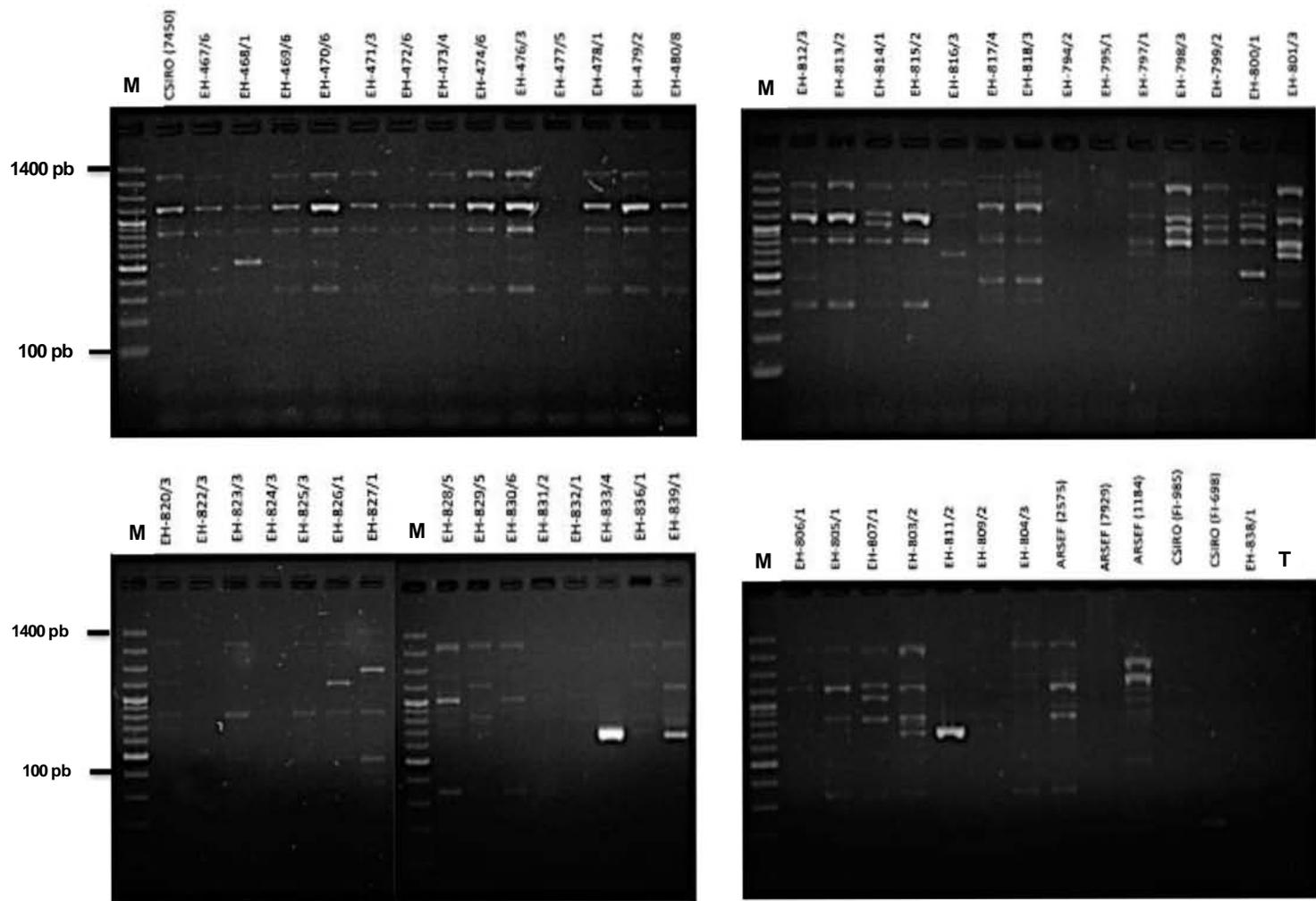


Fig. 21. Geles con perfiles de bandas generados por RAPD-PCR de los aislados y cepas de referencia de *Metarhizium* utilizando el oligonucleótido T3B. T = testigo negativo. M = escalera de peso molecular. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 60 V, 150 min, con SYBRSafe.

UPGMA

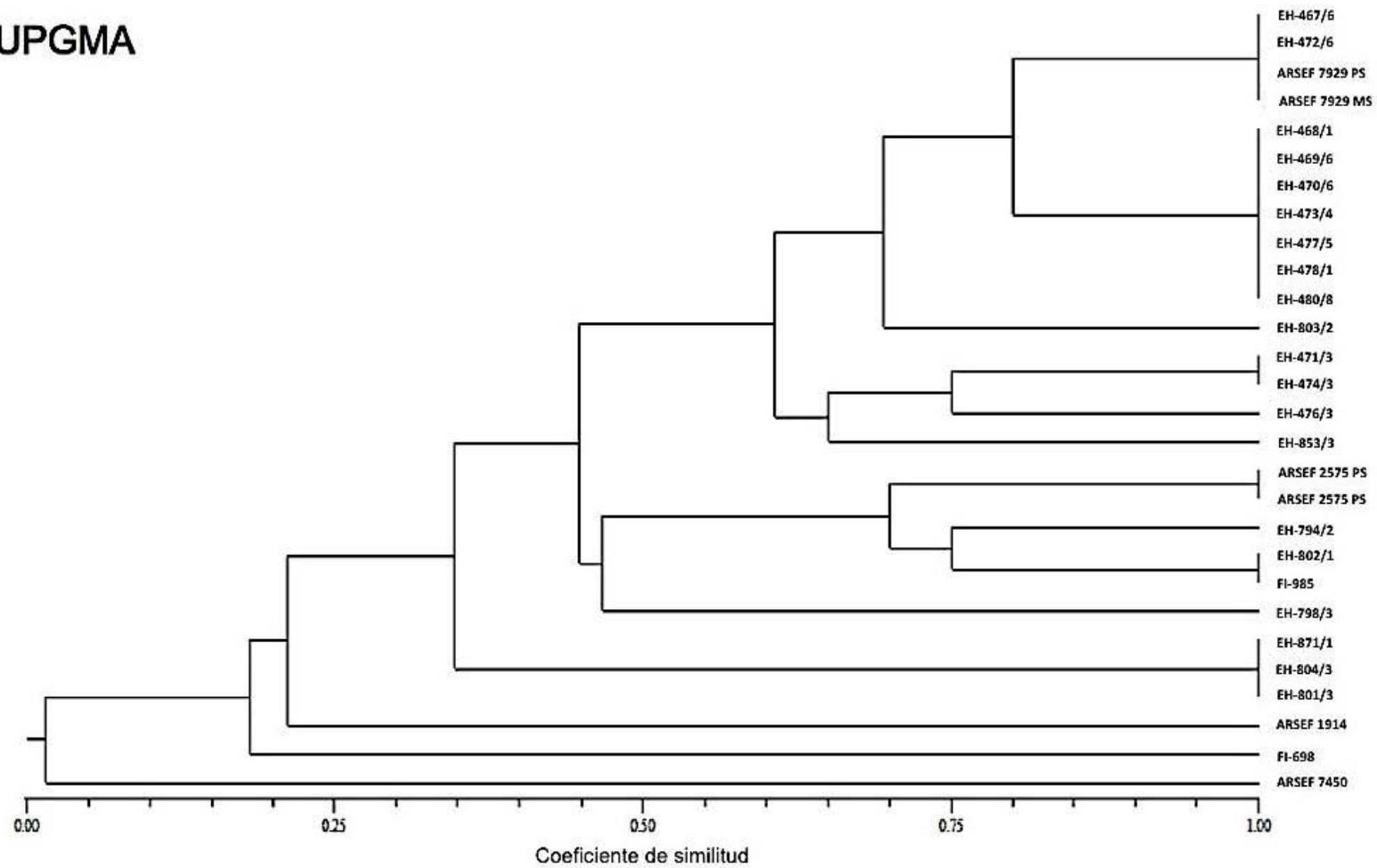


Fig. 22. Dendrograma de los aislados de México y cepas de referencia de *Metarhizium* obtenido por UPGMA con el índice de Jaccard. PS = aislado polispórico. MS = aislado monospórico.

Amplificación y secuenciación

Se realizaron las estandarizaciones correspondientes para las diversas condiciones de PCR, así como para los programas de amplificación para las regiones Pr1, EF1 α , ITS e IGS. La amplificación por PCR de los fragmentos antes mencionados fue específica, obteniendo productos de PCR para ITS de 600 pb (Fig. 23 A), TEF de 900 pb (Fig. 23 B), Pr1 de 500 pb (Fig. 23 C) e IGS de 1100 pb (Fig. 23 D). Los productos de PCR se ajustaron a 50-100 ng/ μ L en un volumen final de 20 μ L para su secuenciación.

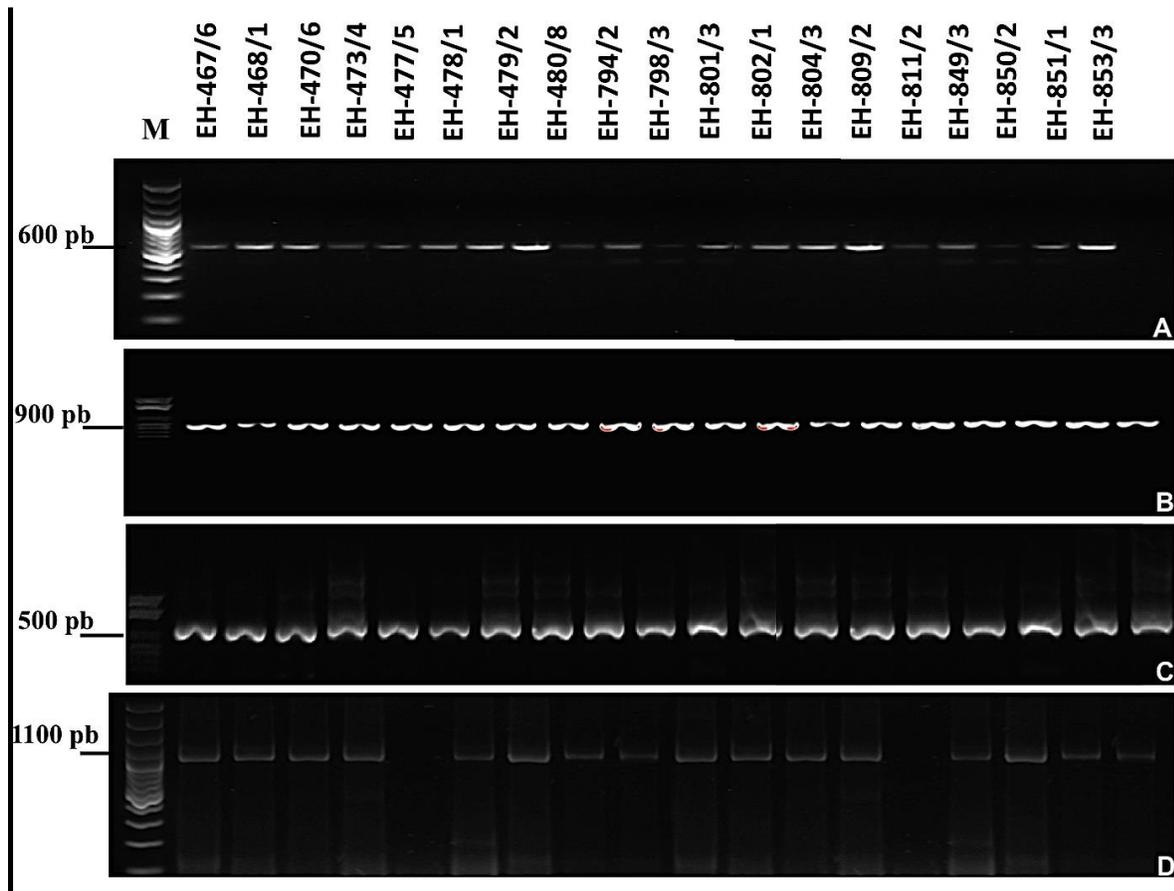


Fig. 23. Amplificación por PCR de las regiones (A) ITS, (B) TEF, (C) Pr1, (D) IGS de los aislados de *Metarhizium* de México. T = testigo negativo. M = Escalera de tamaño molecular de 100 pb. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 60 V, 90 min, con GelRed.

Análisis de polimorfismos

El análisis de RFLP de 5´EF1 α utilizando las enzimas de restricción *Mse*I y *Xho*I exhibieron tres distintos perfiles de bandas en los aislados de México. El Perfil A con 100 y 500 pb; el perfil B con 300 y 500 pb y el perfil C con una única banda de 600 pb (Fig. 24b, Anexo 6). Estos resultados sugieren la presencia de tres grupos genéticos distintos dentro de los aislados estudiados.

Por otra parte, los perfiles de bandas generados por Pr1, utilizando la enzima *Rsa*I, también generaron tres diferentes perfiles con bandas desde 200 pb hasta 1 kbp (D, E y F) (Fig. 24b, Anexo 6).

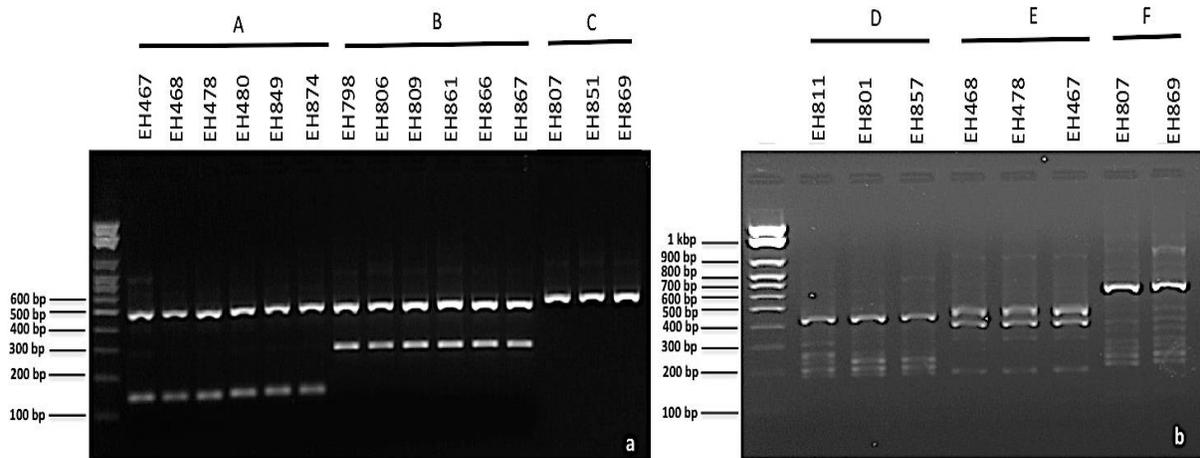


Fig. 24. a) Análisis RFLP de la región 5´TEF con *Mse*I y *Xho*I de 15 aislados b) Pr1 con *Rsa*I de 8 aislados de *Metarhizium* de México. Patrón A (*M. anisopliae*); B (*M. robertsii* y *M. pinghaense*); y C (*M. guizhouense*); D (*M. robertsii* y *M. pinghaense*); E (*M. anisopliae*); y F (*M. guizhouense*). L = Escalera de 100 bp.

Para elucidar la situación filogenética de los aislados y distinguir los grupos genéticos generados por RFLP, se compararon estos resultados con los análisis filogenéticos generados utilizando las regiones ITS, IGS y TEF.

Análisis de datos moleculares

Todas las regiones de ADN utilizadas en este estudio tuvieron una amplificación exitosa presentando una única banda para cada uno de los aislados. Se generaron un total de 282 secuencias (5' y 3') de aislados de *Metarhizium* de México. Se utilizaron las regiones ITS como una herramienta molecular diagnóstica para garantizar la identidad de los aislados utilizados en este estudio, ya que éstos fueron inicialmente caracterizados como *M. anisopliae* únicamente con base en su morfología. Utilizando las secuencias correspondientes a las regiones ITS1 e ITS2 se realizó una búsqueda en el GenBank utilizando el algoritmo BLAST. Todas las secuencias tuvieron una similitud local de al menos 99 % (E value = 0) con cepas correspondientes al complejo *M. anisopliae* depositadas en esta base de datos. El alineamiento de las secuencias ITS fue de 599–620 posiciones alineadas. La hipótesis filogenética se llevó a cabo con el método de Inferencia Bayesiana (IB) incorporando 24 secuencias del GenBank (números de acceso: AF137063.1, AF135214.1, AF138267.1, AF138272.1, AF138268.1, AF138269.1, AF138271.1, AF139854.1, AF138270.1, AF137065.1, AF139855.1, AF137060.1, AF137061.1, AF139851.1, AF137062.1, AF137064.1, AF135210.1, AF135212.1, AF135213.1, AF139852.1, AF139853.1, AF137067.1 AF139856.1; *Beauveria bassiana* utilizada como grupo externo), estas secuencias fueron generadas por Driver et al. (2000). Además, se incluyeron al análisis las

secuencias ITS correspondientes a *M. pinghaense* (ARSEF 7929), *M. robertsii* (ARSEF 2575) y *M. anisopliae* (ARSEF 7450), las cuales fueron generadas en este trabajo. Todos los taxones terminales identificados por Driver et al. (2000) fueron resueltos como filogenéticamente distintos en este análisis, generando 8 distintos clados monofiléticos. Todas las secuencias correspondientes a los aislados de México formaron un clado monofilético con una $pp = 1$, con las secuencias identificadas previamente como *M. anisopliae*, sin embargo, la relación de *M. robertsii* y *M. pinghaense* no fue resuelta, debido a la falta de sitios informativos en esta región como ya se había mencionado en trabajos previos como el de Driver et al. (2000), Bischoff et al. (2009) y Kepler y Rehner (2013). Ninguna secuencia correspondiente a los aislados de México fue identificada como *M. lepidiotae*, *M. acridum*, *M. flavoviride*, *M. minus*, *M. novozealandicum*, *M. flavoviride* Tipo E, ni *M. album* (Fig. 25).

Al igual que las regiones ITS, las secuencias parciales de TEF correspondientes a los aislados de *Metarhizium* de México, fueron sometidas a una búsqueda en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BLAST. Todas las secuencias tuvieron una identidad local de al menos 99 % (E value = 0) con cepas del complejo *M. anisopliae* depositadas en esta base de datos. Para el análisis filogenético se utilizaron 55 secuencias provenientes del GenBank correspondientes al análisis realizado por Bischoff et al. (2009) (números de acceso DQ463978, DQ463988, DQ463994, EU248844-95; *M. frigidum* como grupo externo).

El alineamiento de las secuencias EF1 α generó 746–781 posiciones alineadas. Se distinguieron once clados monofiléticos. Todas las secuencias correspondientes a los aislados de México usados en este estudio formaron clados con una alta pp (0.97) con secuencias correspondientes al clado PARB (*M. pinghaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. brunneum*) del complejo *M. anisopliae* definido por Bischoff et al. (2009). De los aislados estudiados, 23 fueron agrupados con cepas de referencia correspondientes a *M. anisopliae* con una pp de 0.97; 14 aislados con *M. robertsii*, con una pp de 1; 2 aislados con *M. pinghaense* con una pp de 1 y 2 aislados con *M. guizhouense* con una pp de 1. Ninguna secuencia correspondiente a los aislados de México fue identificada como *M. brunneum*, *M. majus*, *M. lepidiotae*, *M. acridum*, *M. frigidum*, ni como *M. flavoviride* (Fig. 26).

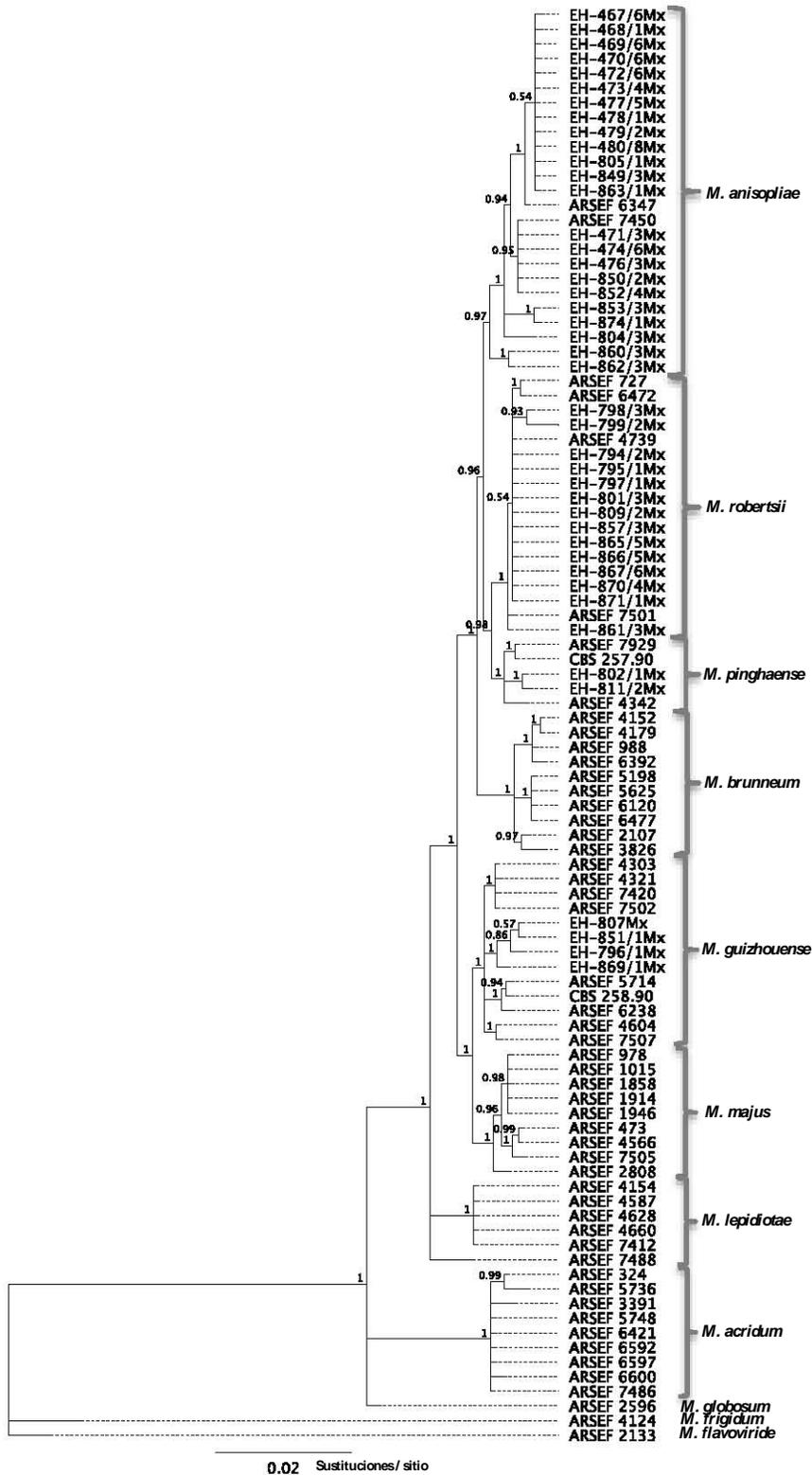


Fig. 26. Árbol consenso de mayoría inferido por IB de la región TEF de los aislados de México y cepas de referencia. Los números arriba de las ramas representan las probabilidades posteriores. El grupo externo es *M. flavoviride*.

Se analizó la asociación entre los clados generados por TEF con el hospedero, el tipo de hábitat, el origen geográfico, la virulencia, la capacidad endófito, termotolerancia y patrones RFLP.

En cuanto al hospedero y tipo de hábitat, destaca el hecho de que los aislados que formaron un clado con *M. robertsii* y *M. pinghaense* fueron obtenidos de coleópteros en cultivos de maíz, mientras que para los aislados resueltos como *M. anisopliae* los hospederos principalmente fueron hemípteros y lepidópteros en cultivos de caña de azúcar. Los aislados de *M. guizhouense* comparten diferentes hospederos y hábitats.

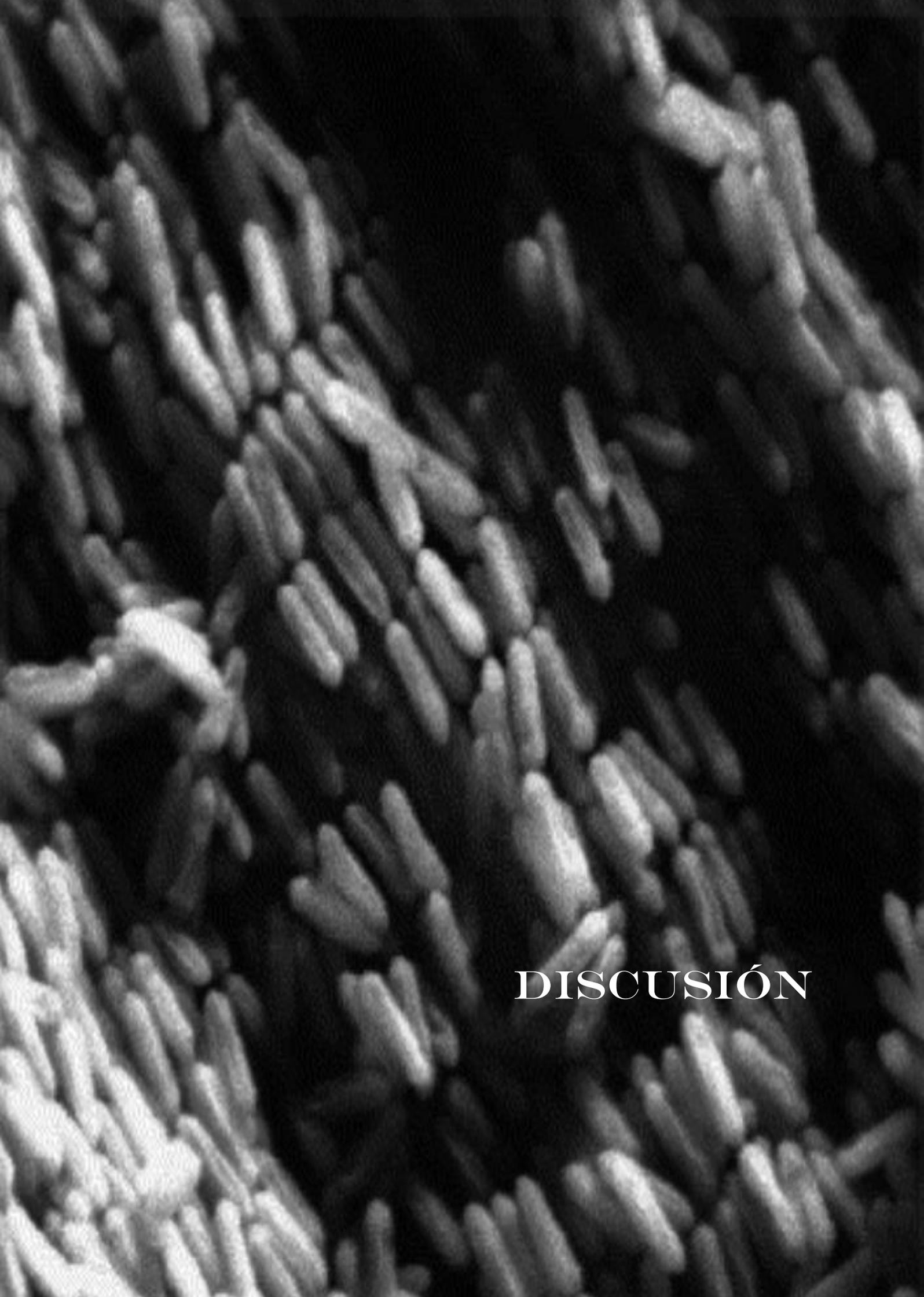
Con los datos generados no fue posible determinar una relación en cuanto a origen geográfico, virulencia y capacidad endófito. Sin embargo, fue posible corroborar la existencia de tres grupos genéticos distintos dentro de los aislados estudiados y corroborar su identidad molecular por dos métodos (RFLP e IB), siendo el grupo A generado por RFLP utilizando la región TEF identificados como *M. anisopliae*, el grupo B como *M. robertsii* y *M. pinghaense* y el grupo C como *M. guizhouense* (Fig. 24a). Los patrones de bandas generados por Pr1, corresponden a *M. robertsii* y *M. pinghaense* y cuatro aislados del clado *M. anisopliae* (grupo D), *M. anisopliae* (Grupo E) y *M. guizhouense* (Grupo F) (Fig. 24b).

Se llevó a cabo una búsqueda en el GenBank con las secuencias IGS correspondientes a los aislados de *Metarhizium* de México, todas las secuencias tuvieron una identidad local del 99 % (E value = 0) con especies del complejo de *M. anisopliae*.

Para este análisis se utilizaron secuencias generadas por Kepler y Rehner (2013) obtenidas del GenBank (Números de acceso: KC164552-60).

El alineamiento consistió en 940-1218 posiciones alineadas. El árbol generado agrupó todas las secuencias correspondientes a los aislados de México dentro del clado PARB

con una pp de 1, excepto por cuatro secuencias (EH-796/1, EH-874/1, EH-794/2 y EH-870/4). La topología generada por IB de esta región no fue consistente con la topología generada con TEF por lo que no fue posible determinar la identidad molecular de los aislados. Ninguna de las secuencias fue identificada como *M. brunneum*, *M lepidiotae*, *M. acridum* o *M. globosum* (Fig. 27).



DISCUSIÓN

Desde la clasificación de Tulloch en 1976, en donde se identificaron tres especies de *Metarhizium* con sus respectivas variedades, no había surgido cambio en este género, sin embargo, en los últimos quince años las herramientas moleculares y el concepto de especie filogenética, han elucidado la existencia de especies crípticas dentro, siendo actualmente consideradas 30 especies (Kepler et al. 2014). Cada una de éstas poseen características específicas como tolerancia a ciertas temperaturas, mayor o menor virulencia a insectos, hospederos determinados, capacidad de colonizar raíces de plantas y preferencias de hábitats. Por todo esto, es de gran relevancia el estudio de todas estas propiedades antes de implementar el uso habitual y constante de estas especies en los diversos agroecosistemas.

A pesar del uso de *M. anisopliae* como agente de control biológico en México (SENASICA, 2012), existe poca información respecto a la diversidad y distribución de los aislados nativos de México y sus interacciones con la rizósfera de plantas de importancia agrícola. En este trabajo, 43 aislados obtenidos de tres diferentes colecciones de hongos entomopatógenos de México, registrados inicialmente como *M. anisopliae* fueron estudiados evaluando termotolerancia, virulencia, capacidad endófitas, así como realizando su caracterización molecular y filogenia, con el fin de elucidar su identidad.

Uno de los primeros pasos en esta investigación fue la caracterización morfológica (dimensiones de conidios y crecimiento radial en diferentes medios) de los aislados obtenidos, para garantizar su pureza e identidad morfológica. Algunos aislados presentaron características atípicas en las colonias, lo cual pudiera deberse a una degeneración fenotípica espontánea frecuentemente observada en cultivos de hongos filamentosos en medio artificial, como resultado de un proceso de senescencia en las colonias (Wang et al. 2005). Además, la variabilidad en las

colonias fúngicas ha mostrado ser dependiente de los diferentes tipos de sustratos, de fuentes de carbono (azúcares, alcoholes), temperatura de incubación y ciclos de luz (Chase et al. 1986). Otra causa reportada de la variabilidad de los aislados de *M. anisopliae* es la plasticidad fenotípica, la cual es la capacidad de un organismo de desarrollar diversos fenotipos dependiendo del ambiente; se ha sugerido que las diferencias en el grado de plasticidad suelen ser debido a la selección natural en respuesta al grado de variación ambiental experimentada (Hoffmann y Parsons, 1991).

Aunque es posible diferenciar muchas especies de este género usando la morfología conidial, su poder es limitado debido a la existencia de especies crípticas en *Metarhizium*. Diversos estudios han mencionado la complejidad de diferenciar especies pertenecientes al complejo *M. anisopliae* debido a que son morfológicamente indistinguibles (Bischoff et al. 2009; Rehner y Buckley, 2005). La similitud morfológica dentro de especies estrechamente relacionadas como es el caso de las especies pertenecientes al complejo *M. anisopliae* (*M. robertsii*, *M. pinghaense*, *M. guizhouense*) se ha considerado que puede ser el resultado de una acelerada tasa de aislamiento reproductivo y divergencia genética (Taylor et al. 2000).

Nuestros resultados mostraron que la identificación de los aislados utilizando únicamente caracteres morfológicos es insuficiente pero no debe descartarse. Hay casos en los que los caracteres morfológicos son suficientes y otros en que los moleculares son imprescindibles para el reconocimiento de especies (Crisci, 2006).

Uno de los factores abióticos mas importantes para el desarrollo de estas especies fúngicas en el campo es la tolerancia a temperaturas, ya que ésta puede actuar como una fuerza selectiva en los patrones de distribución poblacional de estos

hongos (Bidochka et al. 2001). Además, es importante evaluar los perfiles de crecimiento *in vitro* para tener una idea del comportamiento de los aislados en el campo. Ninguno de los aislados estudiados mostró tener actividad a bajas temperaturas, a diferencia de trabajos previos que se realizaron estudiando aislados de zonas forestales y agrícolas de Canadá (Bidochka et al. 2001). Sin embargo, los aislados de México presentaron una mayor tolerancia a altas temperaturas (35 °C), aunque su crecimiento fue limitado; esto coincide con trabajos previos realizados con aislados de México (Toriello et al. 2008). Otros trabajos reportan 35 °C como temperatura de crecimiento limitado y temperaturas óptimas de 20 a 30 °C (Dimbi et al. 2004). Estos resultados muestran la necesidad de realizar estudios de termotolerancia de aislados provenientes de diferentes orígenes geográficos, así como el uso de aislados nativos de cada región.

La evaluación de la virulencia de los aislados de México, permite la selección de los aislados más adecuados para el control biológico, pero también brinda información acerca de la pérdida de virulencia por pases y cultivos en medios artificiales (Butt et al. 2016; Wang et al. 2005). En trabajos previos (Toriello et al. 2008) en bioensayos con pupas de *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), los aislados EH-477/5 y EH-478/1 mostraron ser los menos virulentos para este coleóptero, coincidiendo con los resultados de este trabajo.

Este es el primer estudio que investiga la colonización de aislados endémicos de México en raíces de plantas con importancia agrícola (frijol). La mayoría de los aislados ensayados mostraron una interacción con raíces de *P. vulgaris* al día 7, estos aislados fueron identificados por IB como *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. pinghaense* y *M. guizhouense*. Al día 14 la mayoría de los aislados mostró un incremento en las UFC excepto por dos aislados identificados como *M. anisopliae*.

Estos resultados muestran la bifuncionalidad que los aislados pueden tener como patógenos de insectos y endófitos de plantas, aunque se necesitan más estudios para determinar la capacidad endófitica que estos poseen.

Se consideró el uso del marcador universal T3B debido al éxito reportado para la identificación a nivel de especie en complejos de especies como *Sporothrix*, distinguiendo a: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* y *S. schenckii* (De Oliveira et al. 2012). Además este marcador ha sido utilizado para la identificación de las especies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*, las cuales deben de ser distinguidas debido a la sensibilidad que presenta cada una ante diferentes antimicóticos (Thanos et al. 1996). Este método tiene la ventaja de no necesitar secuenciación, haciéndolo una herramienta fácil, rápida y económica para la identificación de aislados que han sido caracterizados únicamente con base en sus características fenotípicas. Sin embargo, este marcador no fue útil para la distinción de especies dentro del complejo *M. anisopliae*, ya que los perfiles generados y analizados por UPGMA no mostraron relación con el origen geográfico, hospedero, estudios previos ni concordancia con los resultados generados en este estudio.

Los grupos generados por RFLP de la región TEF coinciden con los clados del análisis filogenético utilizando la misma región. Wyrebeck et al. (2011) distinguieron especies estrechamente relacionadas dentro de *Metarhizium* utilizando la misma metodología, obteniendo los mismos patrones de bandas para *M. robertsii* y *M. guizhouense*. Por lo que el método RFLP de la región TEF con las enzimas de restricción *MseI* y *XhoI* podría ser útil como herramienta de diagnóstico rápido, para diferenciar las especies dentro del complejo de *M. anisopliae*, teniendo la ventaja de no requerir secuenciación. En el caso de los grupos generados por RFLP utilizando

la región Pr1 son consistentes con los grupos generados por RFLP e IB con TEF , excepto por los aislados EH-804/3, EH-850/2, EH-853/3 y EH-874/1 que muestran el mismo patrón de bandas (D) tanto para *M. robertsii*, como para *M. pinghaense*. Estos resultados pueden deberse a isoformas del gen Pr1 en cepas de *M. anisopliae* (Leal et al. 1997).

La región TEF ha sido ampliamente utilizada para elucidar límites entre especies en diversos géneros de hongos (Helgason et al. 2003; D` Alessandro et al. 2014). En *Metarhizium*, este fragmento ha mostrado una alta resolución con limitantes en especies estrechamente cercanas (Bischoff et al. 2009; Kepler et al. 2014), sin embargo, sigue siendo considerada una herramienta válida para aclarar los límites de especie en el género *Metarhizium*. Nuestros resultados evidenciaron cuatro especies filogenéticas dentro de los aislados analizados. Además, la filogenia es consistente con otros análisis filogenéticos (Driver et al. 2000; Bischoff et al. 2009). Sin embargo, los patrones generados por RFLP con TEF y Pr1 agrupan *M. robertsii* y *M. pinghaense* como grupos A y D sugiriendo que todos estos aislados pertenecen al mismo grupo genético. *M. robertsii* es morfológicamente indistinguible de *M. anisopliae* y su diagnóstico de otros miembros de este complejo está basado únicamente en cinco nucleótidos fijos en el TEF (Bischoff et al. 2009). Pantou et al. (2003) utilizando secuencias IGS, obtuvieron un clado monofilético con un buen soporte que incluía a *M. anisopliae*, *M. pinghaense* y *M. robertsii*, sin embargo, no se pudo elucidar la relación de las últimas dos. Huang et al. (2005) consideraron a *M. anisopliae* y *M. pinghaense* como análogos con base en las secuencias ITS y caracteres morfológicos, pero Bischoff et al. (2009) retomó el nombre *M. pinghaense* (ex-type CBS 257.90) con base en el análisis multilocus realizado para el complejo *M. anisopliae*. De acuerdo a Taylor et al. (2000) la solución a este problema es el

uso de más de un locus polimórfico, debido a que las genealogías deben de ser concordantes a los efectos de aislamiento genético, deriva y coalescencia. Sin embargo, la designación filogenética estará susceptible a cambios, ya las cepas genotipificadas representan pobremente la verdadera diversidad dentro de un complejo de especies. Además, la utilización de un único linaje para designar especies sin una identificación de características fenotípicas que distinga a las especies es altamente controvertido y plantea un problema sin resolver sobre cómo se deben de usar los diferentes genomas para la delimitación de especies y por último, como es el caso de muchos hongos filamentosos, el uso único de un enfoque cladista es inapropiado debido a que presentan diversas tasas de recombinación, clonalidad e hibridación dentro y entre linajes (Know-Chung et al. 2017).

Las regiones ITS, RPB1, RPB2 y BTUB incluyendo TEF han sido ampliamente estudiadas en filogenia de hongos y del género *Metarhizium*. Las regiones ITS se incluyeron debido a que la Red del Código Internacional de la Vida (International Barcode of Life Network) las ha sugerido como el fragmento para el proyecto de ADN barcoding (código de barras), el cual tiene como objetivo estandarizar segmentos del genoma para la identificación de especies en todos los reinos de la vida (Schoch, 2012). Esta región a pesar de no tener la resolución filogenética que posee la región IGS o TEF como se ha demostrado en trabajos previos (Kepler y Rehner 2013), tiene ventajas como: el éxito de amplificación por PCR (Mahmoud y Zaher, 2015), áreas altamente conservadas con una tasa evolutiva más acelerada y un alto número de copias en el genoma (Schoch et al. 2012), además es considerada área blanco para análisis de diversidad fúngica (Bellemain et al. 2010), lo que ha convertido a las ITS en una herramienta de diagnóstico inicial, además de

brindar información sobre la filogenia utilizando regiones no codificantes. Los resultados de nuestro estudio son consistentes con trabajos previos a la misma escala filogenética (Driver et al. 2000). Las regiones ITS agruparon todos los aislados estudiados y secuencias correspondientes a *M. robertsii* y *M. pinghaense* dentro de un clado monofilético no teniendo la resolución mostrada del análisis con TEF.

Otra región incluida en este estudio fueron las IGS (oligonucleótidos MZIGS3), ya que fue considerado el loci más adecuado para la inferencia filogenética a nivel de especie en el género *Metarhizium* por Kepler y Rehner (2013), al ser analizado junto con otras secuencias utilizando un método desarrollado por Townsend (2007). Nuestros resultados usando estos oligonucleótidos no fueron consistentes con los obtenidos usando TEF. Además, la topología generada agrupó un clado conformado únicamente por 11 aislados de México con una pp cercana a 1. Para aclarar estos resultados será necesario incluir un mayor número de loci, lo cual nos permitirá adoptar un enfoque de reconocimiento de especies filogenéticas como lo menciona Taylor et al. (2000).

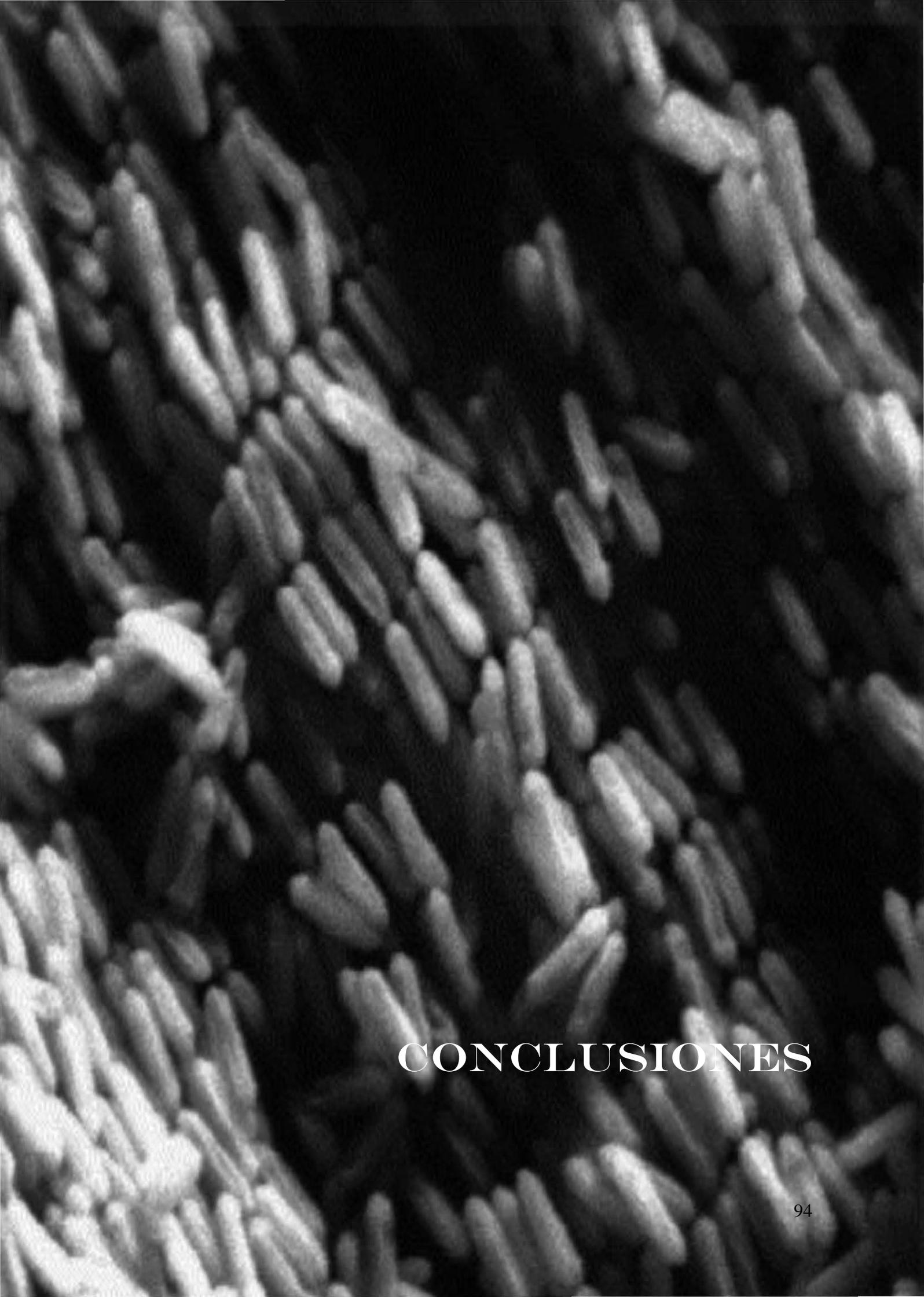
La mayoría de los aislados identificados como *M. anisopliae* fueron aislados de hospederos hemípteros en cultivos de caña de azúcar y algunos otros aislados de hospederos lepidópteros, mientras que la mayoría de aislados identificados como *M. robertsii* fueron aislados de coleópteros en cultivos de maíz. Estos resultados sugieren una posible relación entre *M. anisopliae* e insectos cuyos estadios se llevan a cabo en el follaje de las plantas, lo cual coincide con Hernández-Domínguez et al. (2017) quienes determinaron la diversidad de aislados de *Metarhizium* obtenidos de *Aeneolamia* spp. (Hemiptera) utilizando secuencias de TEF e ITS. Por otra parte, nuestro estudio reveló que los aislados identificados como *M. robertsii*

fueron aislados de insectos con periodos prolongados en suelos, coincidiendo con los hallazgos reportados por Lopes et al. (2013) quienes observaron una elevada ocurrencia de *M. robertsii* asociada con adultos de *Phyllophaga capillata* (Coleoptera: Melolonthidae) y Rocha et al. (2011) quienes evaluaron la ocurrencia de *Metarhizium* spp. en suelos del centro de Brasil, identificando ocho aislados de *M. robertsii*. Por otro lado, nuestros resultados muestran que todos los aislados identificados como *M. robertsii* presentaron un incremento de UFC/g en las raíces de *P. vulgaris* al día 14, estos resultados sugieren un aumento en la esporulación en la rizosfera, lo cual puede deberse a fotosintato depositado en las raíces de la planta, el cual es una fuente importante de carbón disponible para microbios (Butler et al. 2003). Además el hecho de que *M. anisopliae* (ARSEF 2575) (ahora *M. robertsii*) tiene la capacidad de adherirse a la epidermis de algunas plantas debido a la proteína MAD2 (Wang y St. Leger 2007) sugiere que es un hongo adaptado a la rizósfera (Bruck, 2010).

Ninguno de los aislados analizados en este estudio fue identificado como *M. brunneum*, la cual es una especie perteneciente al clado PARB del complejo de *M. anisopliae*. En trabajos previos, Carrillo-Benítez et al. (2013) y Muñiz-Reyes et al. (2014) identificaron *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. pingshaense* de plagas de importancia agrícola pero no *M. brunneum*. Hasta ahora, estos resultados sugieren una baja ocurrencia de *M. brunneum* en México en zonas agrícolas, en contraste con Steinwender et al. (2014) de Dinamarca en donde evaluaron la comunidad de *Metarhizium* en suelos agrícolas y zonas con setos, siendo la especie más frecuentemente aislada *M. brunneum*.

Otros estudios como los de Bidochka et al. (1998) y Vänninen et al. (1996) atribuyen características a *M. anisopliae* de ser una especie “agrícola” al ser más

frecuentemente aislada de ambientes perturbados, coincidiendo con Schneider et al. (2012) quienes evidenciaron altas densidades de *M. majus*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, y *M. robertsii* en muestras de suelo de pastizales y zonas limítrofes de agrocultivos, indicando que estos hábitats semi-naturales brindan refugio a estas especies fúngicas. En contraste, en el caso de los agroecosistemas daneses, Meyling y Eilenberg (2007) describieron que *M. anisopliae* fue escasamente hallado de suelos en zonas de setos en una localidad danesa a diferencia de *B. bassiana*.



CONCLUSIONES

- Hasta el momento no hay evidencia dentro de los aislados evaluados de existir tolerancia a bajas temperaturas.
- Es el primer estudio que realiza experimentos utilizando aislados nativos de México, para determinar la asociación con raíces de una leguminosa de importancia económica (*P. vulgaris*).
- El análisis por RAPD-PCR utilizando el marcador universal T3B no evidenció diferentes grupos genéticos y no fue concordante con las otras metodologías utilizadas para la identificación de especies dentro de los aislados de *Metarhizium* de México.
- El análisis por RFLP mostró ser una herramienta útil y reproducible en especies cercanas de *Metarhizium*.
- Los análisis filogenéticos evidenciaron la existencia de 4 grupos genéticos diferentes dentro de los aislados estudiados.

Nuestro estudio demostró por primera vez en el país, la existencia de 4 diferentes especies dentro de los aislados nativos de *Metarhizium*; además de su asociación con raíces de plantas. Esta información puede brindar una plataforma para un enfoque racional e integral en su utilización en el control biológico. Es necesario realizar más investigaciones respecto a la asociación de especies de *Metarhizium* con insectos considerados plaga, así como al hábitat en el que se encuentran.



LITERATURA CITADA

- Alonso-Díaz MA, García L, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutierrez R, Angel-Sahagún CA, Rodríguez-Vivas RI, Fragosó-Sánchez H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet Parasitol.* 2007;147:336-340.
- Amiri-Besheli B, Khambay B, Cameron S, Deadman ML, Butt TM. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycol Res.* 2000;104:447-452.
- Bale JS, Van Lenteren JC, Bigler F. Biological control and sustainable food production. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363:761-776.
- Barelli L, Moonjely S, Behie SW, Bidochka MJ. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Mol Biol.* 2016;90:657-664.
- Barrera JF. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: Rodríguez-del-Bosque LA, Arredondo-Bernal HC, editores. *Teoría y aplicación del control biológico.* Sociedad Mexicana de Control Biológico México; 2007. p. 303.
- Barrientos-Lozano L y Almaguer-Sierra P. Manejo sustentable de chapulines (Orthoptera: Acridoidea) en México. *Vedalia.* 2009;13:51-56.
- Barron, GL. (1983). *The Genera of Hyphomycetes from Soil.* Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida. pp. 33-35.
- Bautista-Galvez A y Gonzalez-Cortes N. Tres dosis de *Metarhizium anisopliae* sobre la mosca pinta (*Aeneolamia* spp.) en caña de azúcar en la región de "Los Ríos", estado de Tabasco. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.* 2005;21:37-40.
- Behie SW y Bidochka MJ Insects as a Nitrogen Source for Plants. *Insects.* 2013;4:413–24. doi:10.3390/insects4030413.
- Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science.* 2012;336:1576–77.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kausserud H. ITS as an Environmental ADN Barcode for Fungi: An *in Silico* Approach Reveals Potential PCR Biases. *BMC Microbiol.* 2010;10:189. doi:10.1186/1471-2180-10-189.
- Bidochka MJ, Kamp AM, Lavendar MT, Dekoning J, De Croos JNA. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:1335–42.
- Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GAM. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can J Bot.* 1998;76:1198–1204.
- Bidochka MJ, McDonald MA, St Leger RJ, Roberts DW. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification polymorphic DNA (RAPD). *Curr Genet.* 1994;25:107-113.
- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia.* 2009;101:512–30.
- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia.* 2006;98:737-45.
- Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *Am J Bot.* 2011;98:426-38.
- Blanford S y Thomas MB. Host thermal biology: the key to understanding host-pathogen interactions and microbial pest control? *Agric For Entomol.* 1999;1:195-202.
- Boldo JT, Junges A, Amaral KB, Staats CC, Vainstein MH, Schrank A. Endochitinase CHI2 of the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* Affects Its Virulence toward the Cotton Stainer Bug *Dysdercus Peruvians*. *Curr Genet.* 2009;55:551-60.
- Boomsma JJ, Jensen AB, Meyling NV, Eilenberg J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annu Rev Entomol.* 2014;59:467-85.
- Braga GUL, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ, Roberts DW. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Photochem Photobiol.* 2001;74:734-39.
- Bruck DJ. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *BioControl.* 2010;55:103-112.

- Brunner-Mendoza C, Moonjely S, Reyes-Montes R, Toriello C, Bidochka M. Physiological and phylogenetic variability of Mexican *Metarhizium* strains. *BioControl*. 2017a: DOI 10.1007/s10526-017-9839-3
- Brunner-Mendoza C, Navarro-Barranco H, León-Mancilla B, Pérez-Torres A, Toriello C. Biosafety of an entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* in an acute dermal test in rabbits. *Cutan Ocul Toxicol*. 2017b;35 DOI: 10.3109/15569527.2016.1156122.
- Burgner D, Eagles G, Burgess M, Procopis P, Rogers M, Muir D, Pritchard R, Hocking A, Priest M. Disseminated invasive infection due to *Metarhizium anisopliae* in an immunocompromised child. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1146–50.
- Butler JL, Williams MA, Bottomley PT, Myrold DD. Microbial Community Dynamics Associated with Rhizosphere Carbon Flow. *Microbial Community Dynamics Associated with Rhizosphere Carbon Flow*. *App Environ Microbiol*. 2003;69:6793–6800. doi:10.1128/AEM.69.11.6793.
- Butt TM, Coates CJ, Dubovskiy IM, Ratcliffe NA. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Adv Genet*. 2016; 94: 307-64. Elsevier Ltd. doi:10.1016/bs.adgen.2016.01.006.
- Byers RA y Wells HD. Phytotoxemia of coastal bermudagrass caused by the two lined spittlebug, *Prosapia bicincta* (Homoptera:Cercopidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer*. 1996;59:1067-71.
- Carrillo-Benítez MG, Guzmán-Franco AW, A la Torre-Rosas R, Enríquez-Vara JN. Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microb Ecol*. 2013;65:437–49.
- Carvalho MJA, Amorim JRS, Daher BS, Silva-Pereira I, Freitas MS, Soares C y Felipe MSS. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 2003;39:204-10.
- Chase AR, Osborne LS, Ferguson VM. Selective Isolation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* From an Artificial Potting Medium. *Fla Entomol*. 1986;69:285-292 doi:10.2307/3494930.
- Chen WH, Han YF, Liang JD, Liang ZQ, Jin DC. *Metarhizium dendolimatilis*, a novel *Metarhizium* species parasitic on *Dendrolimus* sp. Larvae. *Mycosphere*. 2017;8:31-37.
- Clarkson J, Screen S, Bailey A, Cobb B, Charnley K. Fungal pathogenesis in insects. En: Bridge P, Couteaudier Y, Clarkson J, editors. *Molecular variability of fungal pathogens*. Oxon: CABI publishing; 1998 p. 83-94.
- Cobb BD y Clarkson JM. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. *FEMS Microbiol Lett*. 1993;112:319-24.
- Cole GT, Hoch HC, editores. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York: Plenum: 1991.
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, COFEPRIS. (2005). Reglamento en material de registros, autorizaciones de importación y exportación y certificados de exportación de plaguicidas, nutrientes vegetales y sustancias y materiales tóxicos y peligrosos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 28 de diciembre del 2004 y vigentes a partir de 29 de marzo del 2005.
- Cracraft J. Species concept and speciation analysis. In Johnston, R.F. (Ed.). *Current Ornithology* (v. 1). New York, Plenum Press. 1983:159-87.
- Crisci JV. Espejos de Nuestra Época: Biodiversidad, Sistemática Y Educación. *Gayana Bot*. 2006;63:106–14. doi:10.4067/S0717-66432006000100006.
- Curl EA y Truelove B. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag. Berlin. 1986:288
- Curran J, Driver F, Ballard JWO, Milner RJ. Phylogeny of *Metarhizium*: Analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycol Res*. 1994;98:547-52.
- D'Alessandro CP, Jones LR, Humber RA, López Lastra CC, Sosa-Gomez DR. Characterization and Phylogeny of *Isaria* spp. Strains (Ascomycota: Hypocreales) Using ITS1-5.8S-ITS2 and Elongation Factor 1-Alpha Sequences. *J Basic Microbiol*. 2014;54:1–11. doi:10.1002/jobm.201300499.
- Da Silva MV, Santi L, Staats CC, Da Costa AM, Colodel EM, Driemeier D. Cuticle Induced En- do/Exoacting Chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* Is Encoded by an Ortholog of the chit3 Gene. *Res Microbiol*. 2005;156:382-92.

- De García MC, Arboleda ML, Barraquer F, Grose E. Fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. J Med Vet Mycol. 1997;35:361-63.
- De Oliveira MME, Sampaio P, Almeida-Paes R, Pais C, Gutierrez-Galhardo MC y Zancope-Oliveira RM. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. J Clin Microbiol. 2012;50: 2159–62. <http://doi.org/10.1128/JCM.00450-12>
- Demain AL y Fang A. The natural functions of secondary metabolites. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2000;69:1-39.
- Dimbi S, Nguya KM, Slawomir AL, Mueke JM. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. BioControl. 2004;49:83–94.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 1991;19:4008.
- Donzelli BGG y Krasnoff SB. Molecular genetics of secondary chemistry in *Metarhizium* Fungi. En Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. Lovett B y St. Leger RJ (eds). Elsevier 2016:365-435.
- Douglas IG, Duke GM, Goettel MS, Kabaluk JT. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. J Invertebr Pathol. 2008;98:101-13.
- Driver F, Milner RJ, Trueman JWH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol Res. 2000;104:134-50.
- Dumas C, Robert P, Pais M, Vey A, Quiot JM. Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. Comp Biochem Physiol. 1994;108:195-203.
- Eguchi H, Toibana T, Hotta F, Miyamoto T, Mitamura Y, Yaguchi T. Severe fungal sclerokeratitis caused by *Metarhizium anisopliae*: a case report and literature review. Mycoses. 2015;58:88–92.
- Fernandes EKK, Keyser CA, Chong JP, Rangel DEN, Miller MP, Roberts DW. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. J Appl Microbiol. 2009;108:115-28.
- Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Alonso-Morales RA, Lezama-Gutiérrez R, Rodríguez-Rodríguez JC, Cervantes-Chávez JA. Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. Med Vet Entomol. 2016;31:36-43.
- Fisher JJ, Rehner SA, Bruck DJ. Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. J Invertebr Pathol. 2011;106:289-95.
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and Phenotypic Description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., Previously Recognized as the Non-California Population of *Coccidioides immitis*. Mycologia. 2002;94:73–84.
- Fitter AH y Garbaye J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. Plant Soil. 1994;159:123-32.
- Fungaro MHP, Vieira MLC, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. Lett Appl Microbiol. 1996;22:389-92.
- Gao Q, Jinn K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, Shang Y, Duan Z, Hu X, Xie XQ, Zhou G, Peng G, Lou Z, Huang W, Wang B, Fang W, Wang S, Zhong Y, Ma LJ, St Leger RJ, Zhao GP, Pei Y, Feng MG, Xia Y, Wang C. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLOS Genet. 2011;7, e1001264.
- García de León S y Mier T. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente. 2010; 10,37–63. Retrieved from <http://132.248.9.34/hevila/Sociedadesruralesproduccionymedioambiente/2010/vol10/no20/2.pdf>.
- Garza-Hernández JA, Rodríguez-Pérez MA, Salazar MI, Rusell TL, Adeleke MA, de Luna-Santillana EJ, Reyes-Villanueva F. Vectorial capacity of *Aedes aegypti* for dengue virus type 2 is reduced with co-infection of *Metarhizium anisopliae*. PLOS Negl Trop Dis. 2013;7(3), e2013, doi:10.1371/journal.pntd.0002013
- Geiser DM, Jiménez-Gasco MM, Kang S, Mkalowska I, O'Donnell K. FusariumIDv1.0: A ADN sequence database for identifying *Fusarium*. Eur J Plant Pathol. 2004;110:473-79.
- GenBank 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2190>
- Goettel MS e Inglis GD. Fungi: Hyphomycetes. Manual of Techniques in Insect.1997.

- Goettel MS, Hayek AE, Siegel JP, Evans HC. Safety of Fungal Biocontrol Agent en Fungi as Biocontrol Agents. Butt TM, Jackson, Magan N. 2001
- Guerrero-Guerra C, Reyes-Montes MR, Toriello C, Hernández-Velázquez V, Santiago-López I, Mora-Palomino L, Calderón-Segura ME, DoCampo-Fernández S, Calderón-Ezquerro C. Study of the persistence and viability of *Metarhizium acridum* in Mexico's agricultural area. *Aereobiologia*. 2012; 29:249-61.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1996. Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th ed. CABI, Wallingford, UK. 616p.
- Helgason T, Watson IJ, Young JPW. Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from Actin and Elongation Factor 1-Alpha Sequences. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 229:127–32. doi:10.1016/S0378-1097(03)00802-4.
- Hernández-Domínguez C y Guzmán-Franco AW. Species diversity and population dynamics of entomopathogenic fungal species in the genus *Metarhizium*: a spatiotemporal study. *Microbiol Ecol*. 2017;74:194-206.
- Hesketh H, Roy HE, Eilenberg J, Pell JK, Hails RS. Challenges in modeling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl*. 2010;55:55-73.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch T, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot AR, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde K, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CPU, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miądlikowska J, Miller A, Moncalvo J-M, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiß M, White MM, Winka K, Yao Y-J, Zhang N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007;111:509-47.
- Hoffmann AA y Parsons PA. (1991). Evolutionary genetics and environmental stress. Oxford University Press, Oxford 284 pp.
- Hu G y St. Leger RJ. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:6383–87.
- Hua-Li C, Wan-Hao C, Ting-Chi W, Zong-Qi L, Fu-Chong Z, Jian-Dong L, Yan-Feng H. Delimitation of a novel member of genus *Metarhizium* (Clavicipitaceae) by phylogenetic and network analysis. *Phytotaxa*. 2016;288:51-60.
- Huang B, Li C, Humber RA, Hodge KT, Fan M, Li Z. Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae) *Mycotaxon*. 2005;94:137-47.
- Huelsenbeck JP y Ronquist F. MRBAYES: Bayesian Inference of Phylogenetic Trees. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2001; 17: 754–55. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- James TY, Kauff F, Schoch C, Matheny PB, Hofstetter V, Cox C, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G-H, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüßler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Bùdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett D, Lutzoni F, McLaughlin D, Spatafora J, Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature*. 2006;443:818-22.
- Jaronski ST. Soil Ecology of the Entomopathogenic Ascomycetes: A Critical Examination of what we (Think) we know. En: Ekesi S, Maniania NK, Kerala T (eds). Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management Research Signpost; 2007;91-144.
- Jiménez LF y Merchant H (2003). *Biología Celular y Molecular*. México, Pearson Educación
- Kamp AM y Bidochka MJ. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett Appl Microbiol*. 2002;35:74-77.
- Katoh M y Kuma M. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. [Nucleic Acids Res](#). 2002; 30:3059-3066. (describes the FFT-NS-1, FFT-NS-2 and FFT-NS-i strategies)
- Kepler RM, Humber RA, Bischoff JF, Rehner SA. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*. 2014;106:811–29.

- Kepler RM, Rehner SA. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Mol Ecol Resour.* 2013;13:210–17.
- Kepler RM, Ugine TA, Maul JE, Cavigelli MA, Rehner SA. Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environ Microbiol.* 2015;17:2791-2804.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, Bicanic TA, Castañeda E, Chang YC, Chen J, Cogliati M, Dromer F, Ellis D, Filler SG, Fisher MC, Harrison TS, Holland SM, Kohno S, Kronstad JW, Lazera M, Levitz SM, Lionakis MS, May RC, Ngamskulrongroj P, Pappas PG, Perfect JR, Rickerts V, Sorrell TC, Walsh TJ, Williamson PR, Xu J, Zelazny AM, Casadevall A. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere.* 2017; 2:e00357-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00357-16>
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol.* 2015;132:1-41.
- Leal Soraya CM, Bertioli DJ, Butt TM, Carder JH, Burrows PR, Peberdy JF. Amplification and Restriction Endonuclease Digestion of the Pr1 Gene for the Detection and Characterization of *Metarhizium* Strains. *Mycol Res.* 1997;101:257–65. doi:10.1017/S0953756296002560.
- Lee SC, Ni M, Li W, Shertz C, Heitman J. The Evolution of Sex: A Perspective from the Fungal Kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74:298–340. doi:10.1128/MMBR.00005-10.
- Liang Z-Q, Liu A-Y, Liu J L. A New Species of the Genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* Anamorph. *Acta Mycol Sin.* 1991;10:257–62.
- Liu CM, Huang SS, Tzeng YM. Analysis of dextruxins produced from *Metarhizium anisopliae* by capillary electrophoresis. *J Chromatogr Sci.* 2004;42:140-144.
- Liu YJ, Hodson MC y D Hall B. Loss of the Flagellum Happened Only Once in the Fungal Lineage: Phylogenetic Structure of Kingdom Fungi Inferred from RNA Polymerase II Subunit Genes. *BMC Evol Biol.* 2006;6:74. doi:10.1186/1471-2148-6-74.
- Liu ZY, Liang Z, Liu A, Yao Y, Hyde KD, Yu Z. Molecular Evidence for Teleomorph-Anamorph Connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rADN Sequences. *Mycological Res.* 2002;106: 1100-08.
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu Rev Entomol.* 2001;46:667-702.
- Lopes RB, Souza DA, Oliveira CM, Faria M. Genetic Diversity and Pathogenicity of *Metarhizium* spp. Associated with the White Grub *Phyllophaga capillata* (Blanchard) (Coleoptera: Melolonthidae) in a Soybean Field. *Neotrop Entomol.* 2013;42:436–38. doi:10.1007/s13744-013-0146-0.
- Lopez-Giráldez F, Moeller HA, Townsend JP. Evaluating Phylogenetic Informativeness as a Predictor of Phylogenetic Signal for Metazoon, Fungal and Mammalian Phylogenomic Data Sets. *Biomed Res Int.* 2013; Article ID 621604 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/621604>.
- López-Martínez R, Toriello C, Mier T, Ximénez-García C, Martínez A, Fernández-Díez J. Estudio de la patogenicidad de *Conidiobolus coronatus* en animales de experimentación. *Mycopathologia.* 1978;66:59–65.
- Mahmoud AGY y Zaher EHF. Why Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Has Been Selected as the ADN Barcode for Fungi? *Adv Genet Eng.* 2015;4:2–3. doi:10.4172/2169-0111.1000119.
- Martin SH, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET. Structure and evolution of the *Fusarium* mating type locus: New insights from the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Genet Biol.* 2011;48:731-40.
- Mayr E. Speciation phenomena in birds. *The American Naturalist*, University of Chicago Press, American Society of Naturalists. 1940;74:249-278. <http://www.jstor.org/stable/2457576>.
- McNeill J, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'homme van Reine WF, Smith GF, Wiersma JH, Turland NJ, International Botanical Congress. 2012. International code of nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne code); adopted by the 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, Jul 2011. Koenigstein, Germany: Koeltz Scientific Books.
- Meyling NV y Eilenberg J. Ecology of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in Temperate Agroecosystems: Potential for Conservation Biological Control. *Biol Control.* 2007;43:145–55. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.07.007.

- Mier T, Olivares-Redonda G, Navarro-Barranco H, Pérez-Mejía A, Lorenzana M, Pérez-Torres A, Toriello C. Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies. *ANTON LEEUW INT J G*. 2005;88:103–11.
- Mier T, Pérez J, Carrillo-Farga J, Toriello C. Study on the innocuity of *Hirsutella thompsonii*. I. Infectivity in mice and guinea pigs. *Entomophaga*. 1989;34:105–10.
- Mier T, Rivera F, Rodríguez-Ponce MP, Carrillo-Farga J, Toriello C. Infectividad del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. *Rev Latinoam Microbiol*. 1994;36: 107–11.
- Milner JR, Samson P, Morton R. Persistence of conidia of *Metarhizium anisopliae* in sugarcane fields: effect of isolate and formulation on persistence over 3.5 years. *Biocontrol Sci Technol*. 2003;13:507-16.
- Mora C, Titterson DP, Simpson AGB, Worm B. (2011). How many species are there on Earth in the ocean? *PLoS Biol*. 2011;9:e1001127.
- Muñiz-Reyes E, Guzmán-Franco AW, Sánchez-Escudero J, Nieto-Angel R. Occurrence of Entomopathogenic Fungi in Tejocote (*Crataegus mexicana*) Orchard Soils and Their Pathogenicity against *Rhagoletis pomonella*. *J Appl Microbiol*. 2014;117:1450–62. doi:10.1111/jam.12617.
- Mustafa U y Kaur G. UV-B radiation and temperature stress causes variable growth response in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *Internet J Microbiol*. 2008;7(1).
- Nishi O, Hasegawa K, Iiyama K, Yasunaga-Aoki C, Shimizu S. Phylogenetic analysis of *Metarhizium* spp. isolated from soil in Japan. *Appl Entomol Zoo*. 2011;46:301–09.
- Okuno M, Tsuji K, Sato H, Fujisaki K. Plasticity of grooming behavior against entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the *Lasius japonicus*. *J Ethol*. 2012;30:23-27.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2009. http://search.who.int/search?q=toxicidad+de+plagicidas+quimicos&ie=utf8&site=who&client=_es_r&hl=lang_es&lr=lang_es&proxystylesheet=_es_r&output=xml_no_dtd&oe=utf8
- Ortiz-Urquiza A y Keyhani NO. Action on the surface: entomopathogenic fungi *versus* the insect cuticle. *Insects*. 2013;4:357-74.
- Pachamuthu P y Kamble ST. *In vivo* study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against German cockroach (Dyctyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol*. 2000;93:60-70.
- Pal S, St. Leger RJ, Wu LP. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. 2007;282:8969-77.
- Pantou MP, Mavridou A y Typas MA. IGS Sequence Variation, Group-I Introns and the Complete Nuclear Ribosomal ADN of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium*: Excellent Tools for Isolate Detection and Phylogenetic Analysis. *Fungal Genet Biol*. 2003;38:159–74. doi:10.1016/S1087-1845(02)00536-4.
- Pérez-González VH, Guzmán-Franco AW, Alatorre-Rosas R, Hernández-López J, Hernández-López A, Carrillo-Benitez NG, Baverestock J. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *J Invertebr Pathol*. 2014;119:54-61.
- Perrone G, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC, Samson RA. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biol*. 2011;115:1138-50.
- Rahjoo V, Zad J, Javan-Nikkah M, Mirzadi GA, Okhovvat SM, Bihanta MR, Razzaghian J, Klemsdal SS. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *J Plant Pathol*. 2008;90:463-68.
- Ravindran K, Dewen Q, Sivaramakrishnan S. Sporulation characteristics and virulence of *Metarhizium anisopliae* against subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). *Int J Microbiol Res*. 2015;6:01-04.
- Rehner SA y Buckley E. (2005). A *Beauveria* Phylogeny Inferred from Nuclear ITS and EF1-Alpha Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to *Cordyceps* Teleomorphs. *Mycologia*. 2005;97:84–98. doi:10.3852/mycologia.97.1.84.
- Rehner SA y Kepler RM. Genome-assisted Development of Nuclear Intergenic Sequence Markers for Entomopathogenic Fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Mol Ecol Resour*. 2013;13:210-17.

- Revankar SG, Sutton DA, Sanchez SE, Rao J, Zervos M, Dashti F, Rinaldi MG. *Metarrhizium anisopliae* as a cause of sinusitis in immunocompetent hosts. *J Clin Microbiol.* 1999;37:195–98.
- Reyes-Villanueva F, Garza-Hernández JA, García-Munguía AM, Tamez-Guerra P, Howard AF, Rodríguez-Pérez MA. Dissemination of *Metarrhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors.* 2011;4:171. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-4-171>.
- Reynolds DR. The fungal holomorph: An overview. In *The fungal Holomorph: Mitotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* (Reynolds DR y Taylor JW, Eds.), CAB International, Wallingford, UK. 1993:15-25.
- Rezende JM, Zanardo ABR, Da Silva LM, Delalibera I, Rehner SA. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarrhizium* associated with sugarcane agriculture. *BioControl.* 2015;60:495–505.
- Ridell RW. Permanents stained mycological preparations obtained by slide culture. *Micologica.* 1950; 43:265-70.
- Roberts DW y Campbell AS. Stability of entomopathogenic fungi. *Misc Pub Entomol Soc Am.* 1977;10:19-76.
- Roberts DW y Hayek AE. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. En: Leatham GF, editor. *Frontiers in Industrial Mycology.* Chapman & Hill, NY; 1992:144-59.
- Roberts DW y Humber RA. Entomogenous Fungi. En: Cole GT, Kendrick B, editors. *Biology of Conidial Fungi.* Academic Press NY; 1981:201-36.
- Rocha LFN, Inglis PW, Humber RA, Kipnis A, Luz C. Occurrence of *Metarrhizium* spp. in central Brazilian soils. *J Basic Microbiol.* 2011;53:251-59.
- Rodríguez LDA. *Fitoprotección de la caña de azúcar: Plagas.* Universidad Veracruzana, Veracruz. 2004.
- Rombach MC, Humber RA, Roberts DW. *Metarrhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., A pathogen of plant leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Island. *Mycotaxon.* 1986;27:87-92.
- Rombach MC, Humber RA, Evans HC. *Metarrhizium album*, a fungal pathogen of leaf-and planthoppers of rice. *Trans Br Mycol Soc.* 1987;88:451-59.
- Samson RA, Evans HC, Latgé JP. *Atlas of Entomopathogenic Fungi.* Springer-Verlag, The Netherlands. 1988.
- Samuels RJ, Charnley AK, Reynolds SE. The role of destruxins on the pathogenicity of 3 strains of *Metarrhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia.* 1988;104:51-58.
- Sánchez-Pérez CL, Barranco-Florido JE, Rodríguez-Navarro S, Cervantes-Mayagoitia JF, Ramos-Lopez MA. Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Adv Enzymes Res.* 2014;2:65-76.
- Sasan RK y Bidochka MJ. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarrhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Can J Plant Pathol.* 2013;35:288-93.
- Sasan RK y Bidochka MJ. The Insect-Pathogenic Fungus *Metarrhizium robertsii* (Clavicipitaceae) Is Also an Endophyte That Stimulates Plant Root Development. *Am J Bot.* 2012;99:101–7. doi:10.3732/ajb.1100136.
- Schmit JP y Mueller GM. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers Conserv.* 2007;16:99-111.
- Schneider LCL, Silva CV, Pamphile JA, Conte H. Infection, colonization and extrusion of *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in pupae of *Diatrea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). *J Entomol Nematol.* 2013;5:1-9.
- Schneider S, Widmer F, Jacot K, Kölliker R, Enkerli J. Spatial Distribution of *Metarrhizium* Clade 1 in Agricultural Landscapes with Arable Land and Different Semi-Natural Habitats. *Appl Soil Ecol.* 2012;52:20–28. doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.007.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal ADN barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:6241–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Scholte EJ, Knols BG, Takken W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol.* 2006;91:43-49.

- Schrank A y Vainstein MH. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 2010;56:1267-74.
- Schulz B y Boyle C. The endophytic continuum. *Mycol Res*. 2005;109:661-86.
- Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2009. <https://www.gob.mx/sagarpa>.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2012. Ficha técnica: chapulín. <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=21941&idurl=41081>.
- Sharififard M, Mossadegh MS, Zarei-Mahmoudabadi A. Interactions between entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* and sublethal doses of spinosad for control of house fly, *Musca domestica*. *Iran J Arthropod Borne Dis*. 2011;5:28-33.
- Sharon A, Yamaguchi K, Christiansen S, Horwitz BA, Yoder OC, Turgeon BG. An asexual fungus has the potential for sexual development. *Mol Gen Genet*. 1996;251:60-68.
- Siegel JP. Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. En: Lacey L, editor. *Manual of Techniques in insect pathology*. Academic Press NY; 1997. p. 325-336.
- Sorrentino PR, Small CN, Govind S. Quantitative Analysis of Phenol Oxidase Activity in Insect Hemolymph. *BioTechniques*. 2002;32:815-23.
- Sowjanya SK, Padmaja V, Murthy YL. Insecticidal activity of dextruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest Manag Sci*. 2008;64:119-25.
- Spatafora JW, Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, White JF. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Mol Ecol*. 2007;16:1701-11.
- Spatafora JW, Mitchell TG, Vilgalys R. Analysis of genes coding for small-subunit rRNA sequences in studying phylogenetics of dematiaceous fungal pathogens. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1322-26.
- St Leger RJ, Wang C, Fang W. New perspectives on insect pathogens. *Br Mycol Soc*. 2011;25:84-88.
- St. Leger RJ, Joshi L, Roberts D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:709-13.
- St. Leger RJ, Nelson JO, Screen SE. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology*. 1999;145:2691-99.
- St. Leger RJ, Frank DC, Roberts DW, Staples RC. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem*. 1992;204:991-1001.
- Steinwender BM, Enkerli J, Widmer F, Eilenberg J, Thorup-Kristensen K, Meyling, NV. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *J Invertebr Pathol*. 2014;123:6-12.
- Sun S. y Heitman J. Is sex necessary? *BMC Biology*. 2011;9:56.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol*. 2007;57:5-59.
- Tao G, Liu ZY, Hyde KD, Yu ZN. Whole rADN analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla orchracea* (Orchidaceae). *Fungal Divers*. 2008;33:101-22.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Ann Rev Phytopathol*. 1999;37:197-246.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. *Fungal Genet Biol*. 2000;31:21-32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228
- Thanos M, Schönian G, Meyer W, Schweynoch C, Gräser Y, Mitchell G, Presber W, Tietz H. Rapid Identification of *Candida* Species by ADN Fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol*. 1996;34:615-21.
- Thomas MB y Read AF. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Rev Microbiol*. 2007;5:377-83.

- Toriello C, Hernández-Ibáñez JM, López-Martínez R, Martínez A, López-González L, Mier T, Carrillo J, Latgé JP. The pathogenic fungi of the spittlebug in Mexico. III. Innocuity of *Erynia neoaphidis* and *Conidiobolus major* in experimental animals. *Entomophaga* 1986;31:371-76.
- Toriello C, Montoya-Sansón E, Zavala-Ramírez M, Navarro-Barranco H, Basilio-Hernández D, Hernández-Velázquez V, Mier T. Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). *Rev Mex Micol*. 2008;28:57-66.
- Toriello C, Navarro-Barranco H, Martínez JA, Mier T. Seguridad en ratones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp. (Homoptera: Cercopidae) en México. *Rev Mex Micol*. 1999a;15:123-25.
- Toriello C, Pérez-Torres A, Burciaga-Díaz A, Navarro-Barranco H, Pérez-Mejía A, Lorenzana-Jiménez M, Mier T. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolated of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006;65:278-87.
- Toriello C, Pérez-Torres A, Vega-García F, Navarro-Barranco H, Pérez-Mejía A, Lorenzana-Jiménez M, Hernández-Velázquez V, Mier T. Lack of pathogenicity and toxicity of the mycoinsecticide *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* following acute gastric exposure in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009;72:2153-57.
- Toriello C. Bioseguridad de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hyphomycete). *Vedalia*. 2003;9:107-13.
- Toriello C, Pérez-Torres A, Navarro-Barranco H, Mier T, Hernández-Velázquez V. Innocuity and toxicity of Entomopathogenic Fungi. In: *Microbial Insecticides: Principles and Applications*. Borgio JF, Sahayaraj K, AlperSusurluk I. (Eds.). Nova Publishers, USA. pp. 2011;107-20.
- Townsend JP. Profiling Phylogenetic Informativeness. *Systematic Biology*. 2007;56:222–31. doi:10.1080/10635150701311362.
- Tulloch M. The genus *Metarhizium*. *Trans Br Mycol Soc*. 1976;66:407-14.
- Van Lenteren JC. *Internet Book of Biological Control*. 2008 versión 5.
- Vänninen I. "Distribution and Occurrence of Four Entomopathogenic Fungi in Finland: Effect of Geographical Location, Habitat Type and Soil Type." *Mycol Res*. 1996;100:93–101. doi:10.1016/S0953-7562(96)80106-7.
- Vázquez-Martínez MG, Cirerol-Cruz BE, Torres-Estrada JL, López MHR. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease in México. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47:716–22.
- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN, Roy HE. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol*. 2009;2:149-59.
- Vilgalys R y Sun BL. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal ADN sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:4599-4603.
- Walstad JD, Anderson RF, Stambaugh WJ. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J Invertebr Pathol*. 1970;16:221-26.
- Wang B, Kang Q, Lu Y, Bai L, Wang C. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;24:1287-92.
- Wang C y St. Leger RJ. The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell*. 2007;6:808-16.
- Wang C, Butt TM, St. Leger RJ. Colony Sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology*. 2005;151:3223–36. doi:10.1099/mic.0.28148-0.
- Wang CS y St. Leger RJ. A Collagenous Protective Coat Enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:6647-52.
- Watanabe T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. Lewis Publishers, Tokyo, 1994 p.411.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. 1990;38:315-22.
- Williams T, Arredondo-Bernal HC, Rodríguez-del-Bosque LA. Biological pest control in Mexico. *Ann Rev Entomol*. 2013;58:119-40.

- Wu CC, Chen TZ, Liu BL, Wu LC, Chen YC, Tzeng, Hsu SL. Destruxin B isolated from Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* induces apoptosis via a Bcl-2 family-dependent mitochondrial pathway in human nonsmall cell lung cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;548929.
- Wyrebek M, Huber C, Sasan RK, Bidochka MJ. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology.* 2011;157:2904–11.
- Zhao H, Chuan X, Hsiao LL, Xiaoxuan C, St. Leger RJ, Fang W. Host-to-pathogen gene transfer facilitated infection of insects by a pathogenic fungus. *PLoS Pathology.* 2014;10:1004009. doi:10.1371/journal.ppat.1004009
- Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol.* 2007;17:879–920.

ANEXOS

Anexo 1

APD	
Ingredientes	
Agua destilada	1000 mL
Papas blancas	500 g
Dextrosa	20 g
Agar en polvo	15 g

Anexo 2

Lactofenol azul de algodón	
Ingredientes	
Agua destilada	20 mL
Cristales de fenol Q.	20 g
Ácido láctico	20 mL
Glicerina	20 mL
Azul de algodón	0.05 g

Anexo 3

Amortiguador TBE de 10x (1000 mL)
1 Disolver (usando agitador magnético) 108 g de Tris y 55 g de ácido bórico en agua destilada
2 Agrega 40 mL de Na ₂ EDTA a 0.5 M (pH 8.0)
3 Ajustar el volumen a un litro
4 Almacenar a temperatura ambiente
* Para le electroforésis, el TBE se ajusta a 0.5x (dilución 1:10 de la solución 10x en agua desionizada)

Anexo 4. Características morfológicas de los aislados de México y cepas de referencia de *Metarhizium* en medio APD

Aislados	Tamaño de la colonia		Características de la colonia							Color de la colonia				Color central			Aspecto central			Borde		P/A	P/A	Reverso								
	Grande (>70 mm)	Pequeña (<70 mm)	Algodonosa	Aterciopelada	Flocosa	Suave	Concava	Cubierta algodonosa	Centro algodonoso	Café	Verde oscuro	Verde claro	Amarillo	Blanco	Puntos verdes	Verde oscuro	Verde claro	Elevado	Plano	Amarillento	Blanco	Algodonoso	Irregular	Conidios	Exudado	Café	Anaranjado	Amarillo	Incoloro			
EH-467/6	*																															
EH-468/1	*				*				*												*	*										*
EH-469/6	*				*																*	*										*
EH-470/6	*	*			*			*													*	*										*
EH-471/3	*				*																*	*										*
EH-472/6	*				*																*	*										*
EH-473/4	*				*			*													*	*										*
EH-474/6	*				*																*	*										*
EH-476/3	*				*																*	*										*
EH-477/5	*				*	*															*	*						*				*
EH-478/1	*				*				*												*	*										*
EH-479/2	*		*		*			*													*	*										*
EH-480/8	*		*		*			*													*	*										*
EH-849/3	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-850/2	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-851/1	*			*	*									*							*	*										*
EH-852/4	*			*	*									*							*	*										*
EH-853/3	*	*		*	*			*					*								*	*		*								*
EH-857/3	*			*	*									*							*	*										*
EH-860/3	*			*	*									*							*	*										*
EH-861/3	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-862/3	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-863/1	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-865/5	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-866/5	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-867/6	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-868/2	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-869/1	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-870/4	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-871/1	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-874/1	*	*	*		*			*					*								*	*										*
EH-794/2	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-795/1	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-796/1	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-797/1	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-798/3	*	*	*		*			*						*							*	*						*				*
EH-799/2	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-800/1	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-801/3	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-802/1	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-803/2	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-804/3	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-805/1	*	*	*		*			*					*								*	*										*
EH-807	*		*		*			*						*							*	*										*
EH-809/2	*	*	*		*			*						*							*	*										*
EH-811/2	*	*	*		*			*						*							*	*										*
ARSEF 2575	*		*		*			*						*							*	*										*
ARSEF 7929	*		*		*			*						*							*	*										*
ARSEF 7450	*		*		*			*						*							*	*						*				*

Anexo 5. Tasa de crecimiento de los aislados monospóricos de México, *M. robertsii* (ARSEF 2575), *M. pinghaense* (ARSEF 7929) y *M. anisopliae* (ARSEF 7050).

Tasa de crecimiento mm/día ±DS			
EH-467/6	4.17±0.001ABC	EH-480/8	4.17±0.001ABC
EH-468/1	4.17±0.001ABC	EH-794/1	4.22±0.064E
EH-469/6	4.17±0.001ABC	EH-795/1	2.90±0.05E
EH-470/6	4.29±0.001AB	EH-796/1	1.98±0.14F
EH-471/3	4.17±0.001ABC	EH-797/1	4.15±0.11BC
EH-472/6	4.17±0.001ABC	EH-798/3	4.26±0.13AB
EH-473/4	4.35±0.001A	EH-800/1	1.62±0.07G
EH-474/6	4.29±0.001AB	EH-804/1	4.05±0.16C
EH-476/3	4.11±0.246BC	EH-834/3	4.18±0.05ABC
EH-477/5	4.29±0.001AB	2575/1	2.94±0.13E
EH-478/1	4.29±0.001AB	7929/1	2.91±0.055E
EH-479/2	4.05±0.001C	7450/2	3.61±0.05D

ANOVA $\alpha= 0.05$ F= 402.551; g.l. 24, 100; p= 0.001

Los resultados son el promedio de 5 réplicas

*Letras iguales representan que no se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) (Usando la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey).

Anexo 6. Tabla de aislados de México

Código UNAM	Código CNRCB	Identificación morfológica	Identificación molecular	Hospedero	Hábitat	Origen	TL50	Asociación con raíces			Ter motolerancia				RFLP		Códigos de acceso al GenBank	
								7 d	14 d	8 °C	15 °C	28 °C	35 °C	EF-1α	Pr1	TEF	IGS	
EH-467/6	MaZCSA	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz	3.1	150.1	308.5	0.03	1.51	1.58	0.89	B	E	1962978	KY024734	
EH-468/1	MaGBA	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz	3.3	261.2	214.2	0.05	1.39	1.7	0.9	B	E	1962978	KY024735	
EH-469/6	MaGB3A	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz												
EH-470/6	MaGB4	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz	2.3	118.8	167.6	0.03	1.11	1.52	0.85	B	E	1962978		
EH-472/6	MaNP1	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	San Luis Potosí												
EH-473/4	MaNL18	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	San Luis Potosí	2.6	107.8	44.2	0.03	1.36	1.24	0.9	B	E	1962978	KY024736	
EH-474/6	MaNL2	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	San Luis Potosí												
EH-476/3	MaNM2	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	San Luis Potosí												
EH-477/5	MaOPS1	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Oaxaca	3.7	23.7	106.5	0.13	1.27	1.48	0.9	B	E	1962978	KY024737	
EH-478/1	MaOPS2	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Oaxaca	4.4	22.7	247.5	0.04	1.15	1.37	0.88	B	E	1962978	KY024738	
EH-479/2	MaMV	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz	2.8	27.3	114.8	0.09	1.45	1.68	0.82	B	E	1962978	KY024739	
EH-480/8	MaZP	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	Cultivo de caña de azúcar	Veracruz	3.7	95.2	170.2	0.06	1.28	1.58	0.42	B	E	1962978	KY024740	
EH-794/2	Ma103	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Suelo	Campo experimental	Morelos	2.6	346.3	245.4	0.1	1.72	1.69	0.27	A	D	1962978	KY024741	
EH-795/1	Ma104M1	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Lepidoptera	Suelo	Morelos												
EH-796/1	Ma106M1	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. guizhouense</i>	Lepidoptera	Suelo	Morelos												
EH-797/1	Ma107M1	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Lepidoptera	Suelo	Morelos												
EH-798/3	Ma108	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Suelo	D	Morelos	2	145.1	247.9	0.12	1.77	1.71	0.77	A	D	1962978	KY024742	
EH-799/2	Ma109M2	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Lepidoptera	Suelo	Morelos												
EH-801/3	Ma111	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Morelos	2.6	121.9	64.8	0.03	1.13	1.35	0.79	A	D	1962978	KY024743	
EH-802/1	Ma114	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. pinghaense</i>	Coleoptera	D	Morelos	2.8	200.5	109.4	0.14	1.24	1.63	0.19	A	D	1962978	KY024744	
EH-804/3	Ma246	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	D	D		2.4	106.2	192.5	0.05	1.72	1.62	0.77	B	D	1962978	KY024745	
EH-805/1	379	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	D	Colima	1.9	4	37.1	0.04	1.5	1.72	0.45	B	E	1962978	KY024746	
EH-807	HPI-003	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. guizhouense</i>	D	D	Unk	2.7	144.7	292.9	0.04	1.56	1.72	0.08	C	F	1962978	KY024747	
EH-809/2	HPI-031	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	D	D	Morelos	1.5	24	163.2	0.04	1.5	1.66	0.92	A	D	1962978	KY024748	
EH-811/2	HPI-019/4	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. pinghaense</i>	Coleoptera	D	Morelos	2.6	193.3	297.2	0.05	1.37	1.72	0.9	A	D	1962978	KY024749	
EH-849/3	Ma01	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de caña de azúcar	Colima	2.4	65	130	0.05	1.26	1.62	0.85	B	D	1962978	KY024750	
EH-850/2	Ma02	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de caña de azúcar	Colima	2.9	58.6	124.1	0.03	1.51	1.45	0.91	B	D	1962978	KY024751	
EH-851/1	Ma03	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. guizhouense</i>	Lepidoptera	Cultivo de maíz	Colima	1.6	47	119.2	0.04	1.46	1.69	0.88	C	F	1962978	KY024752	
EH-852/4	Ma04M2	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de maíz	Colima												
EH-853/3	Ma05	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera	Cultivo de soya	Tamaulipas	2.2	65.9	172.4	0.03	1.17	1.3	0.86	B	D	1962978	KY024753	
EH-857/3	Ma73	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Jalisco	2	13.4	67.4	0.13	1.41	1.39	0.86	A	D	1962978	KY024754	
EH-860/3	Ma76M3	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Jalisco												
EH-861/3	Ma77	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera	Suelo	Colima	2.4	166	241.5	0.1	1.45	1.71	0.2	A	D	1962978	KY024755	
EH-862/3	Ma78M3	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Suelo	Jalisco												
EH-863/1	Ma79	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera	Suelo	Jalisco	2.5	190.7	92.1	0.06	1.67	1.55	0.9	B	E	1962978	KY024756	
EH-865/5	Ma81	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera	Suelo	Jalisco	3.2	42.4	174	0.09	1.29	1.59	0.88	A	D	1962978	KY024757	
EH-866/5	Ma82	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Jalisco	1.8	57.2	286.3	0.07	1.38	1.71	0.85	A	D	1962978	KY024758	
EH-867/6	Ma83	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera	Cultivo de maíz	Jalisco	1.6	120.4	146.2	0.13	1.78	1.71	0.92	A	D	1962978	KY024759	
EH-869/1	Ma91	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. guizhouense</i>	Coleoptera	Suelo	Nayarit	2.3	79	104.9	0.14	1.17	1.68	0.84	C	F	1962978	KY024760	
EH-870/4	Ma95M4	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera	D	Michoacán												
EH-871/1	Ma96	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera	D	Jalisco	1.9	12.8	162	0.13	0.84	1.21	0.98	A	D	1962978	KY024761	
EH-874/1	Ma377	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	D	Oaxaca	2.2	137.1	179.7	0.05	1.49	1.1	0.13	B	D	1962978	KY024762	

TLM50= Tiempo Letal Medio.

UFC/gr= Unidades Formadoras de Colonias por gramo de raíz de *P. vulgaris*.

RFLP= Las letras corresponden a los grupos generados por Restriction Fragment Length Polymorphism

Physiological and phylogenetic variability of Mexican *Metarhizium* strains

Carolina Brunner-Mendoza · Soumya Moonjely · María del Rocío Reyes-Montes · Conchita Toriello · Michael Bidochka

Received: 19 September 2016 / Accepted: 24 August 2017
© International Organization for Biological Control (IOBC) 2017

Abstract *Metarhizium* Sorokin is a wide spread entomopathogenic fungal genus that is also a root symbiont and some isolates may be potentially useful in agriculture applications. Physiological variations applicable in biological control have not been fully evaluated in Mexican strains. This study identified 30 strains from different insect hosts and states of Mexico selected because they represent the main sugar cane and corn plantations of the country. Their thermotolerance profiles (8, 15, 28 and 35 °C), insect virulence (LT50 in *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae) larvae), possible association with plant roots, and phylogenetic placement (using 5'TEF, IGS sequence information, and RFLP analysis) were assessed. Results showed no cold-active strains and most showed restricted growth at 35 °C. Insect virulence bioassays against *G. mellonella* showed highly virulent strains. Most of the strains

showed an ability to associate with roots of *Phaseolus vulgaris* (Burkart) (Fabales: Fabaceae). RFLP analysis with 5'TEF and Pr1 revealed three distinct genetic groups. Phylogenetic analysis identified the 30 strains as *Metarhizium anisopliae*. (Metchnikoff) Sorokin, *M. robertsii* (J.F. Bisch., Rehner & Humber), *M. guizhouense* (Q. T. Chen & H. L. Guo), or *M. pinghaense* (Q.T. Chen & H.L. Guo), as well as two strains that belong to a new clade (*Metarhizium* sp. indet. 1). These data demonstrate the complexity of *Metarhizium* species and the need to study their physiological and phylogenetic aspects for a more adequate assessment of their potential use in agricultural systems.

Keywords *Metarhizium* · Hypocreales · Clavicipitaceae · Virulence · RFLP · 5'TEF · Pr1

Handling Editor: Helen Roy.

C. Brunner-Mendoza · M. R. Reyes-Montes · C. Toriello (✉)
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico
e-mail: toriello@unam.mx

S. Moonjely · M. Bidochka
Department of Biological Sciences, Brock University,
St. Catharines, ON L2S 3A1, Canada

Introduction

The species belonging to the genus *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are facultative insect pathogenic fungi that can infect over 200 species (Hajek and St. Leger 1994), including pests of agricultural importance. *Metarhizium* species are commonly isolated from soil (Bidochka et al. 1998; Zimmermann 2007; Rocha et al. 2013), and some of them are endophytes (Sasan and Bidochka 2012) and plant rhizosphere colonizers (Hu and St. Leger 2002).

There is considerable cryptic diversity within the *M. anisopliae* complex, and nine species were recognized using multigene phylogenetic methods (Bischoff et al. 2009). These species have shown considerable variation with respect to insect virulence and host specificity (Kepler et al. 2014), temperature profiles (Rangel et al. 2005) and there is evidence that some *Metarhizium* species prefer agricultural habitats (Bidochka et al. 2001) and that some strains are root symbionts (Behie and Bidochka 2014). Therefore, it is relevant to assess these physiological and ecological considerations in order to evaluate the adequacy of these fungi for use in insect biological control and as plant growth promoters in agroecosystems.

The use of microbial agents for biological control in Mexico started 50 years ago and has been increasing since 1990 (Williams et al. 2013). Currently, the “Dirección General de Sanidad Vegetal” (DGSV) through the “Centro Nacional de Referencia de Control Biológico” (CNRCB) has a collection of entomopathogenic fungi, with the purpose to utilize these strains in a biocontrol strategy to regulate crop pests in specific regions and crops in Mexico. Several strains have been used in biocontrol programs in Mexico. For example, *M. acridum* is used to control *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) in the southeast agricultural areas of Mexico and *M. anisopliae* is used to control *Aeneolamia* spp. and *Prosapia* spp. (Hemiptera: Cercopidae), which affects sugar cane fields in diverse regions of Mexico, causing severe economic losses (SAGARPA 2015). Some strains have also been used to control vectors of human disease such as the control of *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) (the main vector of Chagas disease in Mexico) (Flores-Villegas et al. 2016). However, the identification of Mexican *Metarhizium* strains has been restricted to morphological characteristics, and these criteria have limitations when discerning closely related species (Bischoff et al. 2009; Kepler et al. 2014). The aim of this study was to identify 30 native strains obtained from the main agricultural areas of Mexico (eight states) using translation elongation factor 1 alpha partial sequences (5'-TEF), intergenic sequences (IGS, primers MzIGS3) (Kepler and Rehner 2013), restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns, as well as physiological attributes (i.e. temperature profiles, insect pathogenicity, plant root association). These data will be used in a rational assessment for the

implementation of these strains for agricultural pest biocontrol and as plant root symbionts.

Materials and methods

Fungal strains

Thirty strains (morphologically identified as *Metarhizium anisopliae*) were selected in this study with particular attention to the main agricultural areas in Mexico and were obtained from collections of the Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), in Tecomán, Colima, Mexico, and the Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma de Morelos in Cuernavaca, Morelos, Mexico (Table 1). Strains were preserved in sterile water, mineral oil, or liquid nitrogen cryopreservation and then registered in the fungal collection of the Laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and registered at the World Federal Culture Collection (WFCC) to BMFM-UNAM 834. To ensure the purity of each strain, single Spore cultures were prepared from each strain using the method described by Goettel and Inglis (1997) and used throughout the study. The strains were grown on potato dextrose agar (PDA) (DIFCO, USA) for ten days at 27 °C for all further assays.

Assessment of thermotolerances

High and low temperatures may limit the effectiveness of entomopathogenic fungi for insect pest control. *Metarhizium* strains exhibit varying growth profiles at different temperatures (Bidochka et al. 2001). This last feature is relevant in order to select fungal strains to be used for insect biocontrol according to the habitat in which it is to be used. Cold-active and heat-active growth was considered as positive at an absorbance of 630 nm (A_{630}) > 0.25 after 14 days at 8 °C and five days at 35 °C, respectively (Bidochka et al. 2001). Additional assays were performed at 15 and 28 °C. The assessment was performed spectrophotometrically in a 96-well, flat-bottomed cell culture plate filled with 100 µl of potato dextrose agar according to the methods described by Bidochka et al. (2001). Each

Table 1 UNAM codes, identified phylogenetic species, isolation source, habitat, all origins are located in Mexico, LT50, RFLP patterns and GenBank accession numbers

UNAM codes ^a	Identified phylogenetic species	Isolation source	Habitat	Origin	LT50 days	RFLP patterns		GenBank accession numbers	
						5'TEF	Pt1	5'TEF	IGS
EH-467	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Sugar cane field	Veracruz	3.18 ±(2.88–3.50)	B	E	KY616809	KY024734
EH-468	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Sugar cane field	Veracruz	3.32 ±(2.93–3.77)	B	E	KY616810	KY024735
EH-470	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Sugar cane field	Veracruz	2.32 ±(2.11–2.55)	B	E	KY616811	
EH-473	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Sugar cane field	San Luis Potosí	2.58 ±(2.21–3.00)	B	E	KY616797	KY024736
EH-477	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Sugar cane field	Oaxaca	3.69 ±(2.81–4.83)	B	E	KY616798	KY024737
EH-478	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Sugar cane field	Oaxaca	4.36 ±(3.84–4.94)	B	E	KY616799	KY024738
EH-479	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Sugar cane field	Veracruz	2.79 ±(2.46–3.16)	B	E	KY616800	KY024739
EH-480	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Sugar cane field	Veracruz	3.73 ±(2.77–5.00)	B	E	KY616801	KY024740
EH-794	<i>Metarhizium robertsii</i>	Soil	Experimental field	Morelos	2.60 ±(2.25–3.00)	A	D	KY616817	KY024741
EH-798	<i>Metarhizium robertsii</i>	Soil	Unk	Morelos	2.05 ±(1.89–2.21)	A	D	KY616818	KY024742
EH-801	<i>Metarhizium robertsii</i>	Coleoptera	Corn field	Morelos	2.69 ±(2.25–3.20)	A	D	KY616819	KY024743
EH-802	<i>Metarhizium pinghaense</i>	Coleoptera	Unk	Morelos	2.76 ±(2.48–3.06)	A	D	KY616815	KY024744
EH-804	<i>Metarhizium</i> sp.	Unk	Unk	Unk	2.37 ±(1.91–2.94)	B	D	KY616802	KY024745
EH-805	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera	Unk	Colima	1.94 ±(1.71–2.18)	B	E	KY616803	KY024746
EH-807	<i>Metarhizium guizhaense</i>	Unk	Unk	Unk	2.69 ±(1.73–4.18)	C	F	KY616812	KY024747
EH-809	<i>Metarhizium robertsii</i>	Unk	Unk	Morelos	1.54 ±(1.40–1.68)	A	D	KY616820	KY024748
EH-811	<i>Metarhizium pinghaense</i>	Coleoptera	Unk	Morelos	2.56 ±(2.21–2.94)	A	D	KY616816	KY024749
EH-849	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Lepidoptera	Sugar cane field	Colima	2.42 ±(2.18–2.69)	B	D	KY616804	KY024750
EH-850	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Lepidoptera	Sugar cane field	Colima	2.88 ±(2.75–3.02)	B	D	KY616805	KY024751
EH-851	<i>Metarhizium guizhaense</i>	Lepidoptera	Corn field	Colima	1.62 ±(1.46–1.80)	C	F	KY616813	KY024752
EH-853	<i>Metarhizium</i> sp. indet 1	Lepidoptera	Soy Field	Tamaulipas	2.25 ±(2.03–2.48)	B	D	KY616806	KY024753
EH-857	<i>Metarhizium robertsii</i>	Coleoptera	Corn field	Jalisco	1.97 ±(1.81–2.13)	A	D	KY616821	KY024754
EH-861	<i>Metarhizium robertsii</i>	Coleoptera	Soil	Colima	2.39 ±(2.18–2.62)	A	D	KY616822	KY024755
EH-863	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Coleoptera	Soil	Jalisco	2.50 ±(2.29–2.72)	B	E	KY616807	KY024756
EH-865	<i>Metarhizium robertsii</i>	Coleoptera	Soil	Jalisco	3.25 ±(2.78–3.79)	A	D	KY616823	KY024757
EH-866	<i>Metarhizium robertsii</i>	Coleoptera	Corn field	Jalisco	1.75 ±(1.62–1.88)	A	D	KY616824	KY024758
EH-867	<i>Metarhizium robertsii</i>	Coleoptera	Corn field	Jalisco	1.61 ±(1.47–1.75)	A	D	KY616825	KY024759

Table 1 continued

UNAM codes ^a	Identified phylogenetic species	Isolation source	Habitat	Origin	LT50 days	RFLP patterns		GenBank accession numbers	
						5'TEF	Pr1	5'TEF	IGS
EH-869	<i>Metarhizium guizhaense</i>	Coleoptera	Soil	Nayarit	2.30 ±(2.08–2.55)	C	F	KY616814	KY024760
EH-871	<i>Metarhizium robertsii</i>	Coleoptera	Unk	Jalisco	1.92 ±(1.72–2.14)	A	D	KY616826	KY024761
EH-874	<i>Metarhizium</i> sp. indet 1	Lepidoptera	Unk	Oaxaca	2.20 ±(1.99–2.41)	B	D	KY616808	KY024762

LT50: Median Lethal Time ± SE in *G. mellonella*, RFLP: Restriction fragment length polymorphism, codes A–C = 5'TEF profiles and D–F = Pr1 profiles as in Fig. 1a and b, Unk: unknown

^a All originally identified as *M. anisopliae*

well was inoculated with 3 µl of a conidial suspension (10^5 approx.) in 0.01% Triton X-100. The negative control was inoculated with 3 µl of sterile distilled water. All assays were done with $n = 8$.

Insect bioassays

To evaluate the virulence of the strains, bioassays using wax moth larvae (*Galleria mellonella*) (Massasauga Imports, ON, Canada) were carried out. Ten µl of a conidial suspension (10^5 conidia ml⁻¹) (10^3 conidia larva⁻¹) was applied to the insect cuticle, the insects were housed separately in Petri dishes and incubated at 25 °C with a 12:12 L:D cycles. Ten insects were assayed for each of the 30 fungal strains. For the negative control ten insects were assayed applying 10 µl larva⁻¹ of sterile distilled water. Mortality was recorded daily and the median lethal time (LT50) values were calculated by Probit analysis (PoloPlus 1.0).

Plant root association

We assessed the association of strains from Mexico with *Phaseolus vulgaris* (haricot bean). To prevent any unwanted fungal or bacterial growth, seeds were surface-sterilized before use. Seeds were immersed in distilled water for 15 min in a 1000 ml flask and subsequently immersed in 5% sodium hypochlorite solution three times for 2 min. After each sodium hypochlorite wash, seeds were rinsed with sterile distilled water. Seeds were then washed in 70% ethanol for 1 min and subsequently rinsed three times with sterile distilled water to remove all traces of ethanol. Seeds were kept overnight at 4 °C to allow for synchronization of growth.

Sterilized seeds were placed in sterile vermiculite (Schultz Potting Mixture, Brantford, ON, Canada, sterilized three times by autoclaving at 121 °C for 1 h) and kept in a 16:8 L:D photoperiod at 25 °C for germination. For this test, two pots (each with 459 ml volume and previously sterilized for 20 min under UV light) were used per fungal strain. Eighty grams of sterile vermiculite were placed into the pots and five agar plugs (1 cm² each) from a 14 day-old culture of the respective fungal strain were added. Subsequently another layer of sterile soil was added and the seven day-old germinated bean seedlings were planted. A

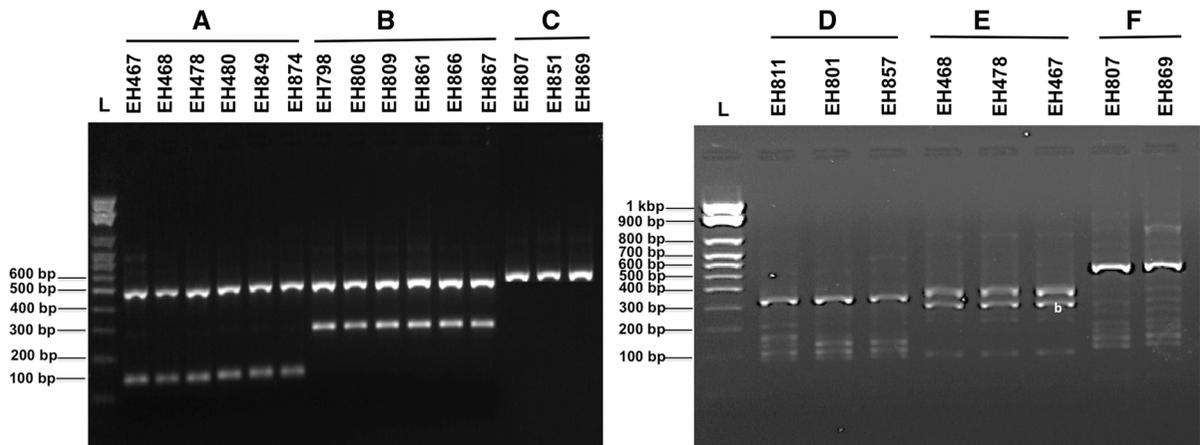


Fig. 1 RFLP analysis **a** 5'TEF *MseI* and *XhoI* of 15 *Metarhizium* strains from Mexico. Pattern A (*M. anisopliae*), B (*M. robertsii* and *M. pinghaense*), and C (*M. guizhouense*); **b** PrI

using *RsaI*. Pattern D (*M. robertsii* and *M. pinghaense*), E (*M. anisopliae*), and F (*M. guizhouense*) of eight *Metarhizium* strains from Mexico. L 100 bp ladder

negative control contained agar plugs without fungal conidia, and strain ARSEF 2575 (*M. robertsii*) was used as a positive control since this strain exhibited endophytic associations under laboratory and field conditions with several plant species (Behie and Bidochka 2014). Each strain, and negative and positive controls were assayed in duplicate. Sterile soil samples were plated onto PDA to monitor microbial contamination before and after experimentation. Plants were monitored regularly and watered daily with sterile distilled water. Seven and fourteen-day-old plants were harvested. Roots were washed with sterile distilled water to remove excess soil. Afterward, the roots were cut, weighed, and placed in a 50 ml Falcon tube with 2.5 ml of sterile distilled water and homogenized using a rotary homogenizer (Greiner Scientific). Four-hundred μl of this homogenate was spread, in duplicate onto selective yeast peptone dextrose agar (YPDA 2 g l⁻¹ yeast extract, 10 g l⁻¹ peptone, 20 g l⁻¹ dextrose, 15 g l⁻¹ agar, 0.5 g l⁻¹ cycloheximide, 0.2 g l⁻¹ chloramphenicol, 0.3 g l⁻¹ 98% dodine and 0.01 g l⁻¹ crystal violet) and incubated at 28 °C in darkness for 14 days. Colony forming units (CFU) per gram of roots were counted based on the characteristic morphology of the *Metarhizium* colony (namely white mycelia and green olive conidia) after seven and 14 days of incubation at 28 °C in darkness. A positive root association with *P. vulgaris* was considered when the CFU g⁻¹ of root was >50. A student's t test was carried out to determine

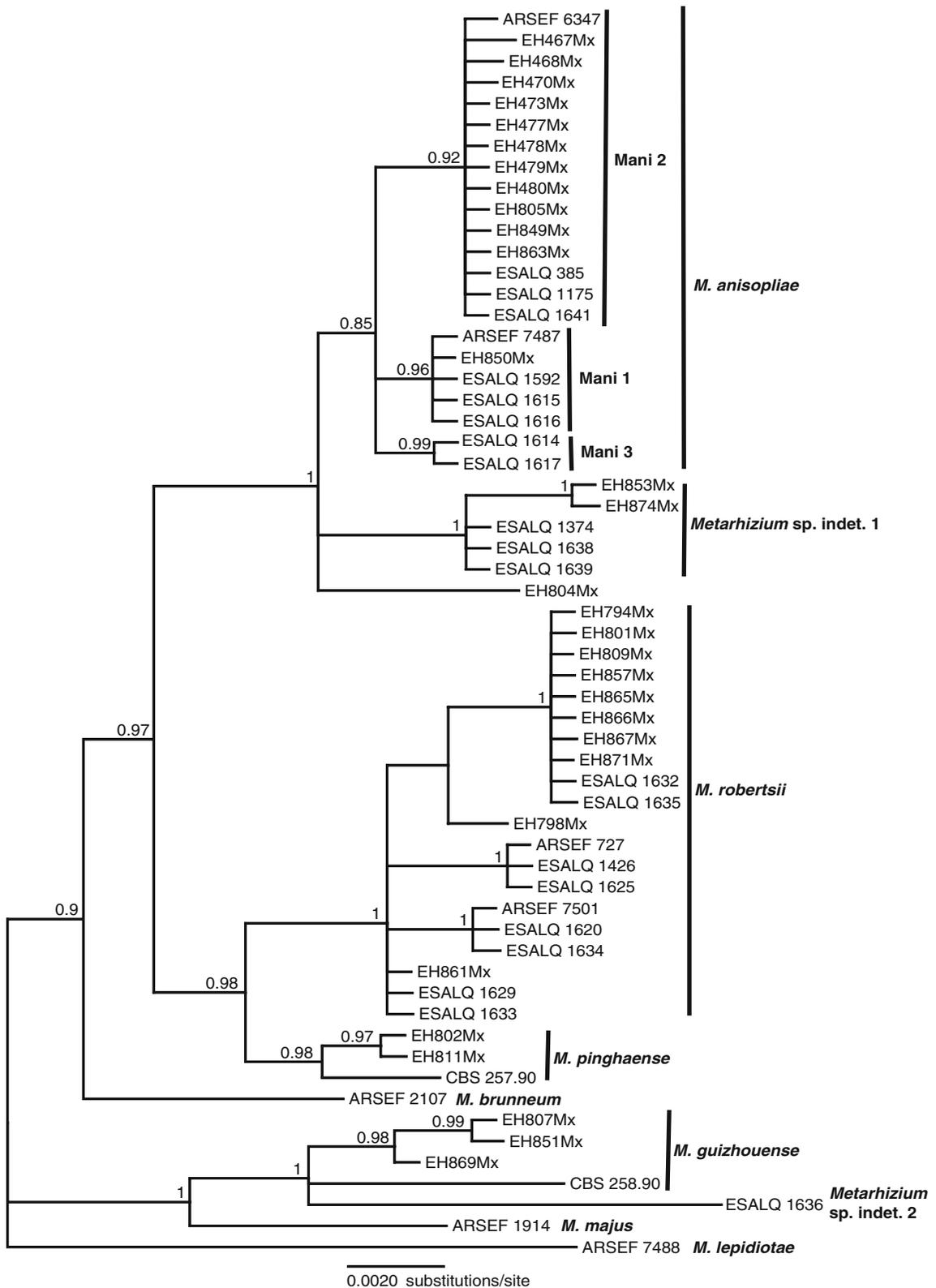
significant difference between CFUs at seven and 14 days with StatPlus v12.0.

DNA extraction

Strains were maintained on potato dextrose agar (PDA) and stored in the dark at 4 °C. Genomic DNA was extracted from fungal cultures by inoculating conidiospores from these strains into 50 ml of 0.2% (w/v) yeast extract, 1% peptone, 2% glucose broth (YPD) in 125 ml flasks. The flasks were shaken at 200 rpm at 27 °C for 3–4 days. The mycelial mat was collected by vacuum filtration onto Fisherbrand P8 filter paper and washed with distilled water. Approximately 2 g of harvested mycelium was frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder using mortar and pestle. Genomic DNA was extracted using DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the conditions described by the manufacturer. A spectrophotometer (MBI nanophotometer) was used for quantification and purity of DNA. These results were also confirmed by gel electrophoresis using 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide.

RFLP analysis, PCR amplification and sequencing

Subtilisin-like protease 1 (Pr1), 5'TEF genes, and IGS were amplified for all strains according to previously described conditions (Leal et al. 1997; Rehner and Buckley 2005; Kepler and Rehner 2013). Pr1 PCR



◀ **Fig. 2** Majority rule consensus phylogram from the Bayesian analysis of the 5'TEF for 30 strains from Mexico (Mx) and sequences from Brazilian isolates (ESALQ) reported by Rezende et al. (2015). *M. lepidiotae* as outgroup. Numbers above branches represent the posterior probability of Bayesian analysis. Mani 1, Mani 2, Mani 3 = subclades of *M. anisopliae* according to Rezende et al. (2015)

products were digested with *RsaI* as previously described (Leal et al. 1997; Bidochka et al. 2001; Small et al. 2004) and 5'TEF PCR products were digested with *MseI* and *XhoI* as described by Wyrebek et al. (2011). The RFLP products were visualized using electrophoresis on a 1% agarose gel, run at 70 V for 45 min in 0.5 × TBE buffer. The 5'TEF and IGS PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen), according to the conditions described by the manufacturer and sent to The Centre for Applied Genomics (TCAG) (Toronto, Canada) for sequencing.

Sequence alignment and phylogenetic analyses

Phylogenetic analysis of 5'TEF was conducted using nine sequences from GenBank corresponding to *Metarhizium* reference strains (Bischoff et al. 2009) (accession numbers DQ463994, DQ463996, EU248849, EU248850, EU248855, EU248862, EU248865, EU248868, EU248881) and 30 sequences corresponding to Rezende et al. (2015) (accession number KP027953-KP027982) were included. In addition, phylogenetic identification using IGS sequences was performed, including sequences from the GenBank reported by Kepler and Rehner (2013) (accession numbers KC164554- KC164560) and Rezende et al. (2015) (accession number KP028013-KP028042). Geneious 8.1.8 software was used to edit sequence data. Alignments were made with MAFFT 7.017 with default settings. Phylogenetic hypotheses were developed by Bayesian inference (BI) with MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) to determine posterior probabilities (PP). The analysis was run four times with each run including four MCMC chains, 1,100,000 generations, sampling every 200 generations, using GTR + G base substitution model. Clades that were supported with 0.7 BI PP or greater values were considered significantly supported by the data. The phylograms are the consensus trees with the mean branch lengths from

Bayesian analyses. All phylogenetic reconstructions were performed with Geneious 8.1.8.

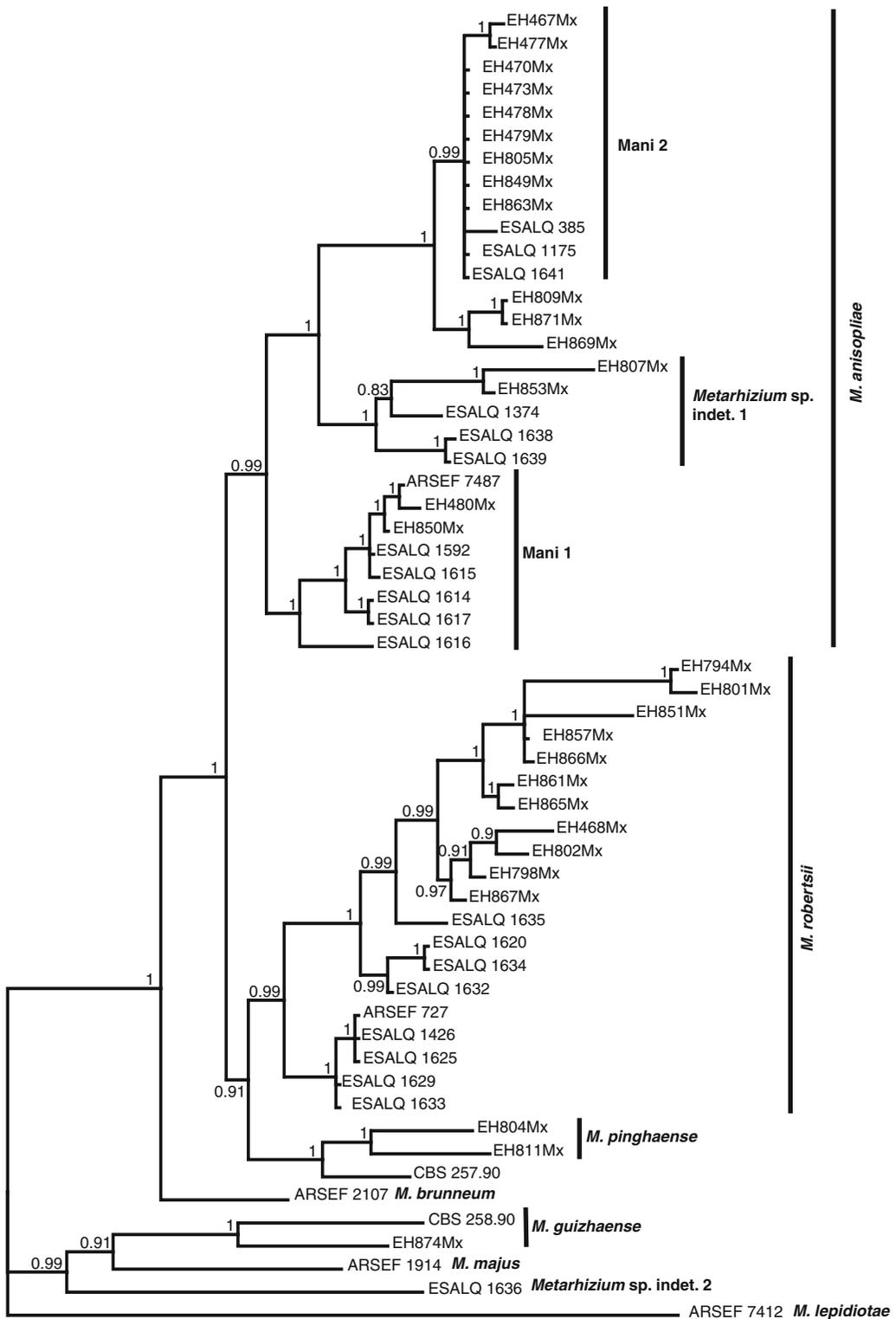
Results

The thermotolerance profiles of *Metarhizium* strains from Mexico showed optimum growth for all strains at 28 °C, with the highest levels of growth found for strains EH798, EH805, EH807, EH811, EH861, EH866, and EH867. None of the strains surpassed the $A_{630} > 0.25$ at 8 °C, suggesting no evidence of cold-active strains from Mexico. There was growth ($A_{630} > 0.25$) at 35 °C for strains from Mexico, except for strains EH802, EH807, EH861, and EH874 that did not surpass the threshold $A_{630} > 0.25$ growth at this temperature. The negative water control did not show contaminant growth at any of the temperatures (A_{630} values = 0.00).

Bioassays with *G. mellonella* showed diverse virulence patterns among strains, with an average LT50 of 2.5 days. The most virulent was EH809 (1.5 days ± 1.40–1.68), and the least virulent was EH478 (4.4 days ± 3.84–4.94). Negative controls showed no signs of fungal infection or mortality during the bioassay period.

Results regarding plant association of fungal strains assayed with *P. vulgaris* roots showed statistically significant differences at seven and 14 days ($p = 0.0007$). Positive controls with strain ARSEF 2575 showed an average of 9.5 CFU g⁻¹ of root at day seven and 195 CFU g⁻¹ of root at day 14. Most of the strains ($n = 21$) showed >50 CFU g⁻¹ of root at day seven, whereas at day 14 there was an increase in CFU and only two strains (EH805 and EH473) consistently showed values of <50 CFU g⁻¹ of root. Despite this, *Metarhizium* was recovered from root homogenates plated on a selective media for all strains used in the study. There was no fungal growth on the negative control plates.

RFLP analysis of 5'TEF, using restriction enzymes, *MseI* and *XhoI*, exhibited three possible banding patterns. Pattern A with 100 and 500 bp bands, pattern B with 300 and 500 bp, and pattern C with just one band of 600 bp (Fig. 1a). These results suggest the presence of three distinct genetic groups among these Mexican strains. On the other hand, restriction fragment profiles for Pr1 using *RsaI* generated three distinct patterns (Fig. 1b) corresponding to patterns D,



0.0070 substitutions/site

◀ **Fig. 3** Majority rule consensus phylogram from the Bayesian analysis of the combined data set of 5'TEF and IGS (MzIGS-) sequences for 30 Mexican *Metarhizium* spp. strains (Mx) and sequences from Brazilian isolates (ESALQ) reported by Rezende et al. (2015). *M. lepidiotae* was used as outgroup. Numbers above branches represent the posterior probability. Mani 1, Mani 2, Mani 3 = subclades of *M. anisopliae* according to Rezende et al. (2015)

E and F. In order to resolve the genetic groups for these RFLP patterns, the 5'TEF was amplified and sequenced. The 5'TEF sequence data sets consisted of 717–771 aligned positions. Bayesian inference produced congruent topologies with the analysis performed by Bischoff et al. (2009). Most of the strains reported in this study were identified as *M. anisopliae* (n = 12), followed by *M. robertsii* (n = 10), *M. guizhouense* (n = 3) and *M. pinghaense* (n = 2), and two indeterminate clades, one referred by Rezende et al. (2015) as *Metarhizium* sp. indet. 1 (n = 2) and the other lineage represented by a single isolate from Mexico (EH804). It is worth mentioning that the *M. anisopliae* clade contains three well-supported subclades (reported previously by Rezende et al. (2015) as Mani 1, 2 and 3. Mani 1 (n = 1), which includes ARSEF 7487, six isolates from Brazil (ESALQ), and one isolate from Mexico; Mani 2 (n = 11) that clustered with strains obtained from *Aeneolamia* sp. (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane fields; Mani 3 (n = 2) with just two isolates from Brazil, previously described by Rezende et al. (2015) as a novel haplotype. *M. robertsii* clade clustered with ten strains obtained mainly from Coleoptera and soils in corn fields (Fig. 2). The IGS sequence data sets consisted of 1160–1184 aligned positions. The phylogenetic tree generated by BI, using IGS sequences with MzIGS3 primers, did not display a clear assignment status for the *M. anisopliae* complex species (data not shown). Combined analysis of 5'TEF and IGS dataset consisted of 1948 aligned positions. There were congruencies with the 5'TEF topology, such as the highly supported monophyly of *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. pinghaense* and *M. guizhouense*. Within the *M. anisopliae* clade we found the subclade corresponding to *Metarhizium* sp. indet. One grouped with two Mexican strains (EH807 and EH853) (Fig. 3). On the other hand, incongruencies were also found: the unresolved identity of several strains (EH809, EH869, EH468, among others), and the well-supported clade *M. guizhouense* constituted by

strains CBS 258.90, ARSEF 1914, ESALQ 1636, and EH874. Neither the IGS dataset nor the concatenated dataset was able to adequately resolve relationships among species. The phylogenetic topologies between 5'TEF and concatenated datasets were heavily incongruent, and not consistent with RFLP patterns.

However, the 5'TEF topology is consistent with the RFLP analysis. Six groups of RFLP patterns were observed, A, B, and C corresponded to 5'TEF variants, and patterns D, E, and F corresponded to Pr1 variants. A and D corresponded to *M. robertsii*/*M. pinghaense*; B and E to Mani 2, except EH849 that shares patterns B and D with strains belonging to Mani 1 and *Metarhizium* sp. indet. 1, all obtained from Lepidoptera, and, finally, patterns C and F that correspond to *M. guizhouense* (Fig. 1a, b). These findings demonstrate the apparent utility of RFLP to provide a quick species identification.

Discussion

Despite the use of *Metarhizium* strains as insect biocontrol agents in Mexico (SENASICA 2016), there is a paucity of information regarding their phylogenetic status and physiological profiles. Here we show thermotolerance profiles, insect virulence, plant root associations, and phylogenetic placement of 30 strains, registered as *M. anisopliae* from two entomopathogenic collections in Mexico.

The genus *Metarhizium* has been subject to extensive molecular revisions and currently up to 30 phylogenetic species (anamorphic and teleomorphic stages) are recognized (Kepler et al. 2014). Some of these are generalist insect pathogens while others have narrower host insect ranges (Hajek and St. Leger 1994). Furthermore some strains and species show preferences for certain habitats and have different temperature growth profiles (Bidochka et al. 2001). Therefore, it is important to assess these parameters before implementing a fungal strain for agricultural use. One of the most important abiotic factors of entomopathogenic fungi for their potential performance in the field is temperature tolerance. Cold-active Mexican strains were not found in this study, in comparison to cold-active isolates from forested and agricultural habitats in Canada (Bidochka et al. 2001). However, heat-active strains showed limited growth at 35 °C, as shown in previous studies from Mexico

(Toriello et al. 2008). Other studies concur that the upper temperature range for *Metarhizium* strains is approx. 35 °C and optimal growth occurs between 20 and 30 °C (Fargues et al. 1992; Dimbi et al. 2004). The application of these biological control agents in tropical and subtropical areas should be directed toward selecting strains adapted to temperatures found in the field. The evaluation of virulence in native strains allows selecting the most suitable for biological control, but also provides information concerning the loss of virulence after subculturing and passage through artificial media (Wang et al. 2005; Butt et al. 2006). The most virulent strains from our study were identified as *M. robertsii* and *M. anisopliae*. However, it is necessary to evaluate a greater number of strains.

This is the first report investigating the association of native strains from Mexico with the roots of a plant of agricultural importance (haricot bean). Strains that showed an association with *P. vulgaris* roots at seven days were phylogenetically identified as *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. pinghaense*, and *M. guizhouense*. This initial report emphasizes the need for more studies on this topic, as these results show the potential bifunctional life style of *Metarhizium*: as an insect pathogen and a root symbiont.

The RFLP patterns of 5'TEF groups were similar to those generated using BI with 5'TEF sequences. Wyrebek et al. (2011) also distinguished closely related species of *Metarhizium* using RFLP patterns similar to those found for *M. robertsii* and *M. guizhouense* here. Therefore, the RFLP of 5'TEF could be a useful diagnostic tool that allows for the differentiation of species within the *M. anisopliae* complex. In the case of RFLP of Pr1, the patterns displayed are consistent with the results of RFLP of 5'TEF and with the tree generated by BI with the 5'TEF, except for EH804, EH850, EH853, and EH874, which share the same pattern (D) as *M. robertsii* and *M. pinghaense*. These results could be due to potentially similar polymorphisms in the Pr1 gene in the various *Metarhizium* phylogenetic species, that is, polymorphisms in the Pr1 gene may be shared across taxonomic lines.

Four phylogenetic species within the Mexican strains initially morphologically characterized as *M. anisopliae* were found, as well as two indeterminate clades. Several studies have mentioned the difficulty

in differentiating species belonging to this complex due to their indistinguishable morphology (Rehner and Buckley 2005; Bischoff et al. 2009). Our results are consistent with other phylogenetic analyses (Driver et al. 2000; Bischoff et al. 2009; Rezende et al. 2015) showing that identification based on morphology underestimates the number of species when compared to a molecular phylogenetic approach.

The 5'TEF fragment has been widely used to elucidate boundaries in several fungal genera (Helgason et al. 2003; D'Alessandro et al. 2014). In *Metarhizium*, this fragment allows for a high resolution, with certain limitations, in closely related species (Bischoff et al. 2009; Kepler et al. 2014) particularly when used to delineate species boundaries within the genus. Our results with 5'TEF sequences agree with Bischoff et al. (2009) concerning the monophyly of terminal taxa in the *M. anisopliae* complex (Fig. 2). We also agree with the resolution of the two new lineages (*Metarhizium* sp. indet. 1 and 2) described by Rezende et al. (2015), because 5'TEF and the concatenated topologies (using 5'TEF and IGS) displayed a clade with a high level of support. A Mexican strain (EH804) seems to be divergent from *Metarhizium* sp. indet. 1, only in 5'TEF topology. Regarding the incongruence between 5'TEF and IGS, gene genealogies could differ substantially in their evolutionary histories, which is difficult to ascertain using multilocus analysis. This phenomenon could be due to initial stages of divergence of closely related taxa that may present incomplete lineage sorting and/or hybridization (Stewart et al. 2014).

RFLP patterns performed with TEF and Pr1 displayed three patterns each. It is not possible to distinguish *M. robertsii* from *M. pinghaense* but there is a correlation of Pr1 RFLP patterns with a particular host insect. All strains that belong to Mani 2 were obtained from Hemiptera, except one (EH849) that was isolated from Lepidoptera, but shares the same pattern with strains isolated from Coleoptera and soils. These results suggest a possible relationship between *M. anisopliae* strains and insects whose stages develop in the foliage of plants. This agrees with Hernández-Domínguez et al. (2016), who determined the specific diversity of 29 isolates of *Metarhizium* from the spittlebug (Hemiptera), which were also identified as *M. anisopliae* using TEF and ITS sequences. In contrast, our study revealed that *M. robertsii* was

isolated mainly from insects with long stages in soils (Coleoptera), similarly to the findings of Lopes et al. (2013), who observed a higher occurrence of *M. robertsii* associated with adults of *Phyllophaga capitata* (Coleoptera: Melolonthidae), and in central Brazilian soils by Rocha et al. (2013). Moreover, our results showed that all strains identified as *M. robertsii* showed an increase of CFU g⁻¹ of roots in the rhizosphere at day 14. In addition, the fact that *M. anisopliae* (ARSEF 2575) (now *M. robertsii*) has the capacity to adhere to the plant epidermis due to the MAD2 protein (Wang and St. Leger 2007) suggests that it is a rhizosphere-competent fungus (Bruck 2010).

It is important to note that, within the strains used in this study, none was identified as *M. brunneum* Petch, despite the phylogenetic proximity of this species with *M. pinghaense*, *M. anisopliae*, and *M. robertsii* reported by Bischoff et al. (2009). In other studies in Mexico, Hernández-Domínguez et al. (2016), Carrillo-Benítez et al. (2013) and Muñíz-Reyes et al. (2014) isolated *M. anisopliae*, *M. robertsii*, and *M. pinghaense* from important agricultural pests of Mexico. However, none were *M. brunneum*. Until now, these data suggest a low occurrence of *M. brunneum* in Mexico in agricultural habitats, in contrast to Steinwender et al. (2014) from Denmark and Fisher et al. (2011) from Oregon, USA, who assessed the *Metarhizium* community in soil from agricultural fields and the surrounding hedgerow, finding *M. brunneum* as the most frequent species.

These results demonstrated that the Mexican *Metarhizium* strains isolated from different sources are variable in species identity, temperature growth profiles, plant root association and insect virulence. This information could provide a platform for a rational approach for their integral use in biocontrol efforts in agroecosystems.

Acknowledgements Brunner-Mendoza C acknowledges the scholarship and financial support provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-346729), as well for the support and training from the Posgrado en Ciencias Biológicas, of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Further thanks for the support and training in phylogenetics provided by Dr. David Gernandt. This paper constitutes a partial fulfillment of the doctoral work of Brunner-Mendoza C in the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. CT acknowledges the financial support by PAPIIT-DGAPA, UNAM, project IT202012, CONACyT project PN 1247, and to the Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (CNRCB) of Tecomán, Colima, MX and the Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) for providing the isolates used in this paper.

References

- Behie SW, Bidochka MJ (2014) Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Appl Environ Microbiol* 80:1553–1560
- Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GAM (1998) Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can J Bot* 76:1198–1204
- Bidochka MJ, Kamp AM, Lavendar TM, Dekoning J, Amritha De Croos JN (2001) Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Appl Environ Microbiol* 67:1335–1342
- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101:512–530
- Bruck DJ (2010) Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *BioControl* 55:103–112
- Butt TQ, Wang C, Shah FA, Hall R (2006) Degeneration of entomogenous fungi. In: Eilenberg J, Hokkanen HMT (eds) An ecological and societal approach to biological control. Springer, Berlin, pp 213–226
- Carrillo-Benítez MG, Guzmán-Franco AW, Alatorre-Rosas R, Enríquez-Vara JN (2013) Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microb Ecol* 65:437–449
- D'Alessandro CP, Jones LR, Humber RA, Lopez LCC, Sosa-Gomez DR (2014) Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1- α sequences. *J Basic Microbiol* 53:1–11
- Dimbi S, Maniania NK, Lux SA, Mueke JM (2004) Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl* 49:83–94
- Driver F, Milner RJ, Trueman JWH (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res* 104:134–150
- Fargues J, Maniania NK, Delmas JC, Smits N (1992) Influence de la température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie* 12:557–564
- Fisher JJ, Rehner SA, Bruck DJ (2011) Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. *J Invertebr Pathol* 106:289–295
- Flores-Villegas AL, Cabrera-Bravo M, Toriello C, Bucio-Torres MI, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A (2016) Survival and immune response of the Chagas vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) against two entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. *Parasit Vectors* 9:176–187
- Goettel MS, Inglis SD (1997) Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA (ed) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, USA, pp 214–249
- Hajek AE, St. Leger RJ (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann Rev Entomol* 39:293–322
- Helgason T, Watson IJ, Young JPW (2003) Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota)

- from actin and elongation factor 1- α sequences. FEMS Microbiol Lett 229:127–132
- Hernández-Domínguez C, Guzmán-Franco AW, Carrillo-Benítez MG, Alatorre-Rosas R, Rodríguez-Leyva E, Villanueva-Jiménez JA (2016) Specific diversity of *Metarhizium* isolates infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane plantations. Neotrop Entomol 45: 80–87
- Hu G, St. Leger RJ (2002) Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. App Environ Microbiol 68:6383–6387
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17:754–755
- Kepler RM, Rehner SA (2013) Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. Mol Ecol Resour 13:210–217
- Kepler RM, Humber RA, Bischoff JF, Rehner SA (2014) Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. Mycologia 106:811–829
- Leal SCM, Bertoli DJ, Butt TM, Carder JH, Burrows PR, Peberdy JF (1997) Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. Mycol Res 101:257–265
- Lopes RB, Souza DA, Oliveira CM, Faria M (2013) Genetic diversity and pathogenicity of *Metarhizium* spp. associated with the white grub *Phyllophaga capillata* (Blanchard) (Coleoptera: Melolonthidae) in a soybean field. Neotrop Entomol 42:436–438
- Muñiz-Reyes E, Guzmán-Franco AW, Sánchez-Escudero J, Nieto-Angel R (2014) Occurrence of entomopathogenic fungi in tejacote (*Crataegus mexicana*) orchard soils and their pathogenicity against *Rhagoletis Pomonella*. J Appl Microbiol 117:1450–1462
- Rangel DEN, Braga GUL, Anderson AJ, Roberts DW (2005) Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. J Invertebr Pathol 88:116–125
- Rehner SA, Buckley E (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF-1 α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* Teleomorphs. Mycologia 97:84–98
- Rezende MJ, Riguetti ZAB, Da Silva LM, Delalibera IJ, Rehner SA (2015) Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. BioControl 60:495–505
- Rocha LFN, Inglis PW, Humber RA, Kipnis A, Luz C (2013) Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. J Basic Microbiol 53:251–259
- SAGARPA (2015) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. In: Importancia de la agroindustria de la caña de azúcar: SAGARPA 2015. <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Ca%C3%B1a.pdf>
- Sasan RK, Bidochka MJ (2012) The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. Am J Bot 99:101–107
- SENASICA (2016) Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. In: Control Biológico en México. <http://senasica.gob.mx/?Idioma=2&id=4157>
- Small CN, Donaldson N, Bidochka MJ (2004) Nucleotide sequence variation does not relate to differences in kinetic properties of neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Curr Microbiol 48:428–434
- Steinwender BM, Enkerli J, Widmer F, Eilenberg J, Thorup-Kristensen K, Meyling NV (2014) Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. J Invertebr Pathol 123:6–12
- Stewart JE, Timmer LW, Lawrence CB, Pryor BM, Peever TL (2014) Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. BMC Evol Biol 14:38
- Toriello C, Montoya-Sanson E, Zavala-Ramírez M, Navarro-Barranco H, Basilio-Hernández D, Hernández-Velázquez V, Mier T (2008) Virulencia y termotolerancia de cultivos monosporicos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). Rev Mex Micol 28:57–66
- Wang C, St. Leger RJ (2007) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. Eukaryot Cell 6:808–816
- Wang C, Butt TM, St. Leger RJ (2005) Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. Microbiology 151:3223–3236
- Williams T, Arredondo-Bernal HC, Rodríguez-del-Bossque LA (2013) Biological pest control in Mexico. Annu Rev Entomol 58: 119–140
- Wyrebek M, Huber C, Sasan RK, Bidochka MJ (2011) Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. Microbiology 157:2904–2911
- Zimmermann G (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Sci Technol 17:879–892

Carolina Brunner-Mendoza is a PhD Biological Sciences candidate in the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine at the Universidad Nacional Autónoma de México. She is part of a team studying basic mycology. Her doctoral research is focused on molecular phylogenetics of *Metarhizium* species and she also has contributed in biosafety protocols of entomopathogenic fungi.

Soumya Moonjely a PhD Biotechnology candidate at Brock University working under the supervision of prof. Michael Bidochka. Her doctoral research is focused on how endophytic fungal species, *Metarhizium* and *Beauveria*, interacts with plants. Prior to her graduate studies at Brock University, she did her Masters degree in applied biotechnology at McGill University.

María del Rocío Reyes-Montes is a full professor at the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México. She has extensive experience in molecular studies of pathogenic fungi, with emphasis on phylogeny of fungi of systemic mycoses.

Conchita Toriello is a full professor at the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, and a member of the Mexican Academy of Sciences (Academia Mexicana de Ciencias). She is a mycologist with experience in fungal pathogens to improve the understanding of fungal strains for biological control in agroecosystems.

Michael Bidochka is a registered specialist microbiologist with the Canadian of Microbiologist. He is professor of biological science at Brock University, associated chair of biological sciences and director of biotechnology at Brock University. His Fungal Pathogenetics laboratory is focused on obtaining knowledge on basic biology and molecular genetics of insect pathogenic fungi effective for biocontrol.