



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y  
EXACTAS

**“CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DEL HONGO  
*Metarhizium* PROVENIENTES DEL NORTE DEL  
ESTADO DE GUANAJUATO CON POTENCIAL DE  
PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL”**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA

Q. IVÁN HORACIO PIÑA TORRES

ASESORES

DR. ISRAEL ENRIQUE PADILLA GUERRERO

DR. JUAN CARLOS TORRES GUZMÁN

Guanajuato, Gto., Septiembre de 2017





UNIVERSIDAD  
DE GUANAJUATO

Guanajuato, Gto., 12 de septiembre de 2017

DR. AGUSTÍN RAMÓN URIBE RAMÍREZ  
Director de la División de Ciencias Naturales y Exactas  
Campus Guanajuato  
Universidad de Guanajuato

PRESENTE

Por medio de la presente hacemos constar que el trabajo de tesis titulado **“Caracterización de aislados del hongo *Metarhizium* provenientes del norte del estado de Guanajuato con potencial de promover el crecimiento vegetal”**, fue realizado por el alumno **Q. IVÁN HORACIO PIÑA TORRES** para obtener el grado de **Maestría en Ciencias (Biología)**. Este trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular de Hongos del Departamento de Biología de esta División bajo nuestra dirección.

Hacemos constar que el trabajo es original, se realizó con la calidad y rigor científico requerido y está concluido, de manera que la estudiante puede presentar su examen de grado.

Atentamente

*Padilla Guerrero*

Dr. Israel Enrique Padilla Guerrero.

Dr. Juan Carlos Torres Guzmán.

Co-Directores de tesis



### AGRADECIMIENTOS

Al soporte financiero del CONACyT (PDCPN2014-248622) y a la Universidad de Guanajuato (CIFOREA 89/2016) para la realización de este proyecto.

CONFIDENCIAL

**ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	I
Guanajuato: Un estado con gran biodiversidad	I
Regiones, clima y suelo del estado: Genera una gran biodiversidad	I
Áreas naturales protegidas del estado de Guanajuato	4
Simbiosis, plantas y hongos	5
Rizósfera	5
El género <i>Metarhizium</i> ; su papel en la rizósfera e interacción mutualista con las plantas	9
Aislamiento de <i>Metarhizium</i>	12
Caracterización molecular de <i>Metarhizium</i>	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	16
Objetivos específicos	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Cepas utilizadas	17
Plantas utilizadas	20
Semillas de sorgo	20
Medios de cultivo	21
Medio dodina (Medio de selección para los aislados <i>Metarhizium</i> )	21
Medio dodina con cristal violeta	21
Medio dodina para resiembra de los aislados de <i>Metarhizium</i>	21
M-100 con dos fuentes de nitrógeno (M100-2N)	21
Solución de sales M-100	22
Solución de elementos traza M-100	22
Medio agar-agua	22
Medio PDA	22
Medio YPD-2	22
Medio Luria-Bertani (LB)	22
Medio LB-Xgal-IPTG, para la selección de recombinantes en los que se interrumpe la región 5' del gen de la Beta-Galactosidasa	23
Plásmidos empleados	23
Vector pGEM®-T Easy	23
Oligonucleótidos empleados	24
Aislamiento de <i>Metarhizium</i>	26
Colecta de muestras de suelo	26
Condiciones de crecimiento e identificación de <i>Metarhizium</i>	26





Obtención de los cultivos axenicos de <i>Metarhizium</i>	26
Obtención de conidios	26
Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad	27
Caracterización del potencial para promover el crecimiento vegetal	27
Bioensayos para la determinación del porcentaje de germinación	27
Métodos de genética y biología molecular	27
Extracción de DNA genómico	27
Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
Purificación de los productos de PCR	29
Clonación en el vector pGEM®-T Easy	29
Transformación de <i>E. coli</i> DH5α por choque térmico	29
Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	30
Tratamiento con endonucleasas de restricción	30
Separación de DNA mediante electroforesis	30
Secuenciación	31
Análisis de las secuencias	31
<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
Estandarización del medio de aislamiento para <i>Metarhizium</i>	32
Obtención de los aislados de <i>Metarhizium</i>	35
Caracterización molecular de los aislados de <i>Metarhizium</i>	38
Identificación de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16	44
Características morfológicas de las nuevas especies	55
Distribución geográfica de los aislados	56
Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad	58
Caracterización del potencial para promover el crecimiento vegetal	64
Bioensayos para la determinación del porcentaje de germinación	64
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>75</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Regiones ecológicas del estado de Guanajuato.	2
Figura 2	Uso del suelo del estado de Guanajuato	3
Figura 3	Representación gráfica de las áreas naturales protegidas del estado de Guanajuato	4
Figura 4	Representación esquemática de las posibles interacciones mediadas por los exudados de las raíces en rizósfera	7
Figura 5	Colonización de la raíz del pasto varilla y el frijol por <i>Metarhizium</i>	10
Figura 6	Asociación mutualista de <i>Metarhizium</i> con las plantas	11
Figura 7	Mapa del vector pGEM®-T Easy y puntos de referencia de la secuencia	23
Figura 8	Estandarización del medio de aislamiento para <i>Metarhizium</i>	33
Figura 9	Obtención de los aislados de <i>Metarhizium</i>	36
Figura 10	Aislados del hongo <i>Metarhizium</i>	37
Figura 11	Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico	39
Figura 12	Amplificación del fragmento del factor de elongación I $\alpha$ (EF-I $\alpha$ )	39
Figura 13	Comprobación de la inserción de un fragmento del gen EF-I $\alpha$ en el vector pGEM-T Easy	40
Figura 14	Árbol filogenético de los aislados obtenidos en el trabajo	41
Figura 15	Porcentaje de identidad entre los aislados de <i>Metarhizium</i>	42-43
Figura 16	Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de los genes $\beta$ T, RPB2, 28S, 18S, PRA y región ITS	45
Figura 17	Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen Beta Tubulina ( $\beta$ T) de los aislados LCP5, LCPI3 y LCPI6	47



Figura 18	Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen de la segunda subunidad de la RNA polimerasa II (RPB2) de los aislados LCP5, LCPI3 y LCPI6	48
Figura 19	Árbol filogenético de la región ITS de los aislados LCP5, LCPI3 y LCPI6	49
Figura 20	Árbol multigénico de los fragmentos de los genes EF-1 $\alpha$ , $\beta$ T, RPB2 y región ITS de los aislados LCP5, LCPI3 y LCPI6	50
Figura 21	Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen 28S de los aislados LCP5, LCPI3 y LCPI6	52
Figura 22	Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen 18S de los aislados LCP5, LCPI3 y LCPI6	53
Figura 23	Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen PR1A de los aislados LCP5, LCPI3 y LCPI6	54
Figura 24	Características morfológicas de las nuevas especies de <i>Metarhizium</i>	56
Figura 25	Distribución geográfica de los aislados de <i>Metarhizium</i>	57
Figura 26	Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad	59-63
Figura 27	Germinación de las semillas de sorgo en interacción indirecta con los aislados de <i>Metarhizium</i>	65
Figura 28	Gráfico de porcentaje de germinación de los aislados de <i>Metarhizium</i>	65
Figura 29	Número de genes de las especies de <i>Metarhizium</i>	70



## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Cepas de <i>Metarhizium</i> y <i>Escherichia coli</i> usadas en este trabajo	17-18
Tabla 2	Aislados obtenidos en este trabajo	19-20
Tabla 3	Oligonucleótidos empleados en este trabajo	24-25
Tabla 4	Cepas usadas para la estandarización del medio de aislamiento	32
Tabla 5	Áreas naturales protegidas donde se realizó el muestreo	35
Tabla 6	Muestras totales, muestras positivas y aislados obtenidos	38
Tabla 7	Porcentaje de identidad de los aislados y cepas de referencia de <i>Metarhizium</i>	43
Tabla 8	Análisis estadísticos del porcentaje de germinación de las semillas de sorgo	66



## ABREVIATURAS

PDA	Papa dextrosa agar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
μL	Microlitros
μg	Microgramos
mL	Mililitros
°C	Grados centígrados o Celsius
g	Gramo
L	Litro
Atm	Atmósfera
Min	Minuto
s	Segundo
m	Metro
spp.	Especies
sp.	Especie
®	Marca Registrada
var.	Variedad
xg	Número de veces el valor la gravedad
Sin.	Sinónimo



## RESUMEN

La biodiversidad en el estado de Guanajuato es muy grande, debido a las variaciones climáticas y geográficas que presenta. Esto genera diversos micro ecosistemas donde la población de microorganismos en el suelo aumenta, tal es el caso del hongo *Metarhizium* el cual ha sido de gran importancia para la agricultura desde hace más de 100 años por uso como biocontrolador de insectos plagas; sin embargo, en estudios recientes se ha descubierto su capacidad mutualista hacia las plantas.

En este trabajo se obtuvieron aislados del hongo *Metarhizium* de áreas naturales protegidas para su caracterización. Se tomaron muestras de la rizósfera de plantas aparentemente sanas de 6 zonas del estado de Guanajuato, las cuales presentan características muy variadas en cuanto a clima, latitud, tipo de suelo, tipo de vegetación y altitud. De estas zonas se lograron obtener 59 aislados pertenecientes al género *Metarhizium*. A estos 59 aislados se les realizó una caracterización molecular, amplificando del factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), identificando la presencia de 4 especies ya reportadas, *Metarhizium brunneum* (42), *Metarhizium robertsii* (12), *Metarhizium anisopliae* (1), *Metarhizium pingshaense* (1) y tres aislados que se agruparon en un clado distinto a los reportados. De los tres aislados no identificados mediante el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), se analizaron las secuencias de los fragmentos de los genes de la Beta Tubulina ( $\beta$ T), segunda subunidad más grande la RNA polimerasa II (RPB2), 28S, 18S, proteasa PR1A y las secuencias de la región ITS, con lo cual se corroboró que se trata de dos nuevas especies a las cuales se les ha propuesto el nombre de *Metarhizium guanajuatense* y *Metarhizium palomense*.

De los aislados obtenidos se determinó la capacidad de conidiar en fotoperiodo y oscuridad. Un 64,40 % de los aislados obtenidos en este trabajo, tienen la capacidad de conidiar en oscuridad en los que destacan los aislados PCP1 de *M. brunneum*, PCP42-6 de *M. anisopliae*, LCP5 de *M. guanajuatense*, SR19 de *M. pingshaense*, CU3 de *M. robertsii* con la capacidad de conidiar en oscuridad. Además se realizaron bioensayos de interacción entre 19 de los aislados obtenidos en este trabajo y la planta *Sorghum vulgare* para determinar el porcentaje de germinación de las semillas. Los resultados muestran que el aislado SR23-1 de *Metarhizium brunneum*, promueve una germinación de las semillas en un 80 %.

En este trabajo, la obtención de los aislados de *Metarhizium* nos ayuda a comprender la biodiversidad de este hongo en las áreas con poca actividad antropogénica del estado de Guanajuato y gracias a la obtención de aislados se puede llegar a un mejor entendimiento sobre las especies de *Metarhizium* así como utilizarlos como una herramienta biotecnológica en la agricultura



## INTRODUCCIÓN

### Guanajuato: Un estado con gran biodiversidad

La diversidad biológica es un concepto que normalmente asociamos con la variedad de especies de animales y plantas observables a simple vista. No obstante, su definición es más amplia y abarca la variedad de las especies vivientes, no sólo las plantas (*plantae*) y animales (*animalia*), sino también, los hongos (*fungi*), protozoarios (*protista*) y bacterias (*monera*). Además, la biodiversidad incluye los ecosistemas que las especies habitan y la variabilidad genética que éstas poseen (Cruz *et al.*, 2012).

El estado de Guanajuato tiene una gran biodiversidad debido a sus diferencias entre regiones, clima y tipos de suelo. El estado se localiza en la parte central de los Estados Unidos Mexicanos. Su rango altitudinal se sitúa entre los 640 msnm y los 3320 msnm. Guanajuato presenta regiones montañosas que comprenden sierras, mesetas y lomeríos, además de valles y llanuras (Cruz *et al.*, 2012).

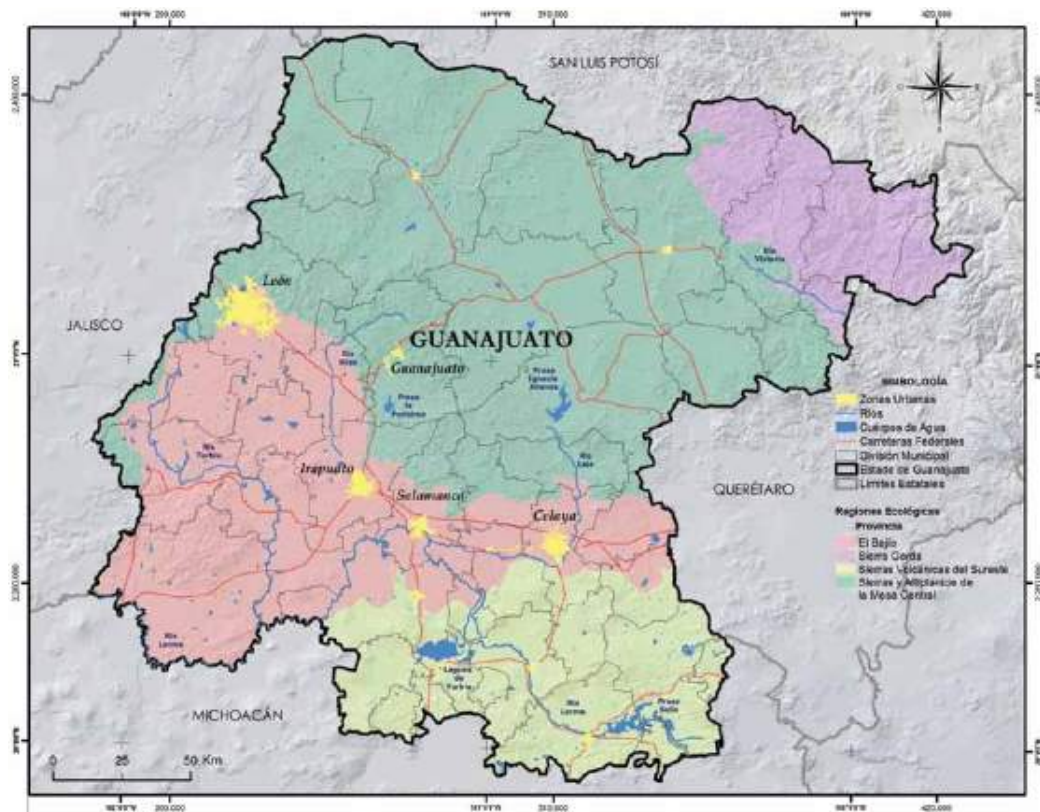
### Regiones, clima y suelo del estado: Genera una gran biodiversidad

El ordenamiento ecológico del territorio del Estado de Guanajuato (1999), divide al estado en cuatro grandes regiones ecológicas (Figura 1).

1. Sierras y Altiplanicie de la Mesa Central Guanajuatense.
2. Sierra Gorda.
3. El Bajío
4. Sierras Volcánicas del Sureste Guanajuatense

En el territorio estatal se localizan tres provincias fisiográficas: en la porción nororiental, la Sierra Madre Oriental; en la parte norte-central, la Mesa del Centro, y en la parte centro-sur, Eje Neovolcánico Transversal (Faja Volcánica Transmexicana o Cinturón Volcánico Mexicano) (Cruz *et al.*, 2012).

Las condiciones atmosféricas del estado influyen de manera directa tanto en la distribución como en el desarrollo, evolución y abundancia de todos los organismos que habitan nuestro planeta, por lo que el conocimiento de lo que comúnmente llamamos clima es esencial para entender los procesos de cambio en la biodiversidad (Cruz *et al.*, 2012). El clima conforma de manera esencial los patrones básicos de estructura y funcionamiento de un ecosistema (Barradas, 1994).



**Figura 1. Regiones ecológicas del estado de Guanajuato.** Se divide en 4 zonas principalmente, de sur a norte; sierras volcánicas del suroeste (verde claro) el Bajío (rosa), sierras y altiplanicies de la mesa central (verde oscuro) y sierra Gorda (morado). Tomada del libro “La Biodiversidad en Guanajuato” (Cruz *et al.*, 2012).

Además del clima, el suelo tiene gran importancia, esta radica en que la combinación de sus diferentes características fisicoquímicas (Figura 2), así como la diversidad de la flora y fauna que sostiene, configuran paisajes naturales, algunos de los cuales resultan tanto en una serie de servicios ambientales como en belleza escénica, variables que pueden ser consideradas para el establecimiento de áreas protegidas o para el desarrollo de actividades ecoturísticas, entre otros instrumentos de conservación y aprovechamiento sustentable (Barradas, 1994). El suelo alberga una gran cantidad y diversidad de seres vivos: bacterias, hongos y otros microorganismos cuya abundancia se estima en millones por metro cuadrado (Chapin *et al.*, 2001). Existe una red compleja de interacciones entre la biodiversidad del suelo, el tipo de vegetación que éste sostiene y el funcionamiento de un ecosistema. La cubierta vegetal de un suelo afecta a la comunidad de organismos que lo habitan y a su vez, la comunidad de organismos determina la productividad y la composición de la cubierta vegetal (Van der Putten, 2005).









## Simbiosis, plantas y hongos

Simbiosis es una asociación entre dos o más especies de diferentes de organismos, esta asociación puede ser permanente, el organismo nunca es separado, o puede ser de larga duración. Los organismos que están involucrados en una simbiosis pueden tener beneficios, ser perjudicados, o no ser afectados por la asociación. Las asociaciones simbióticas son comunes en la naturaleza, las bacterias y los hongos forman alianzas cercanas con las raíces de plantas terrestres (Paracer y Ahmadjian, 2000).

Uno de los tipos de simbiosis muy importante son las micorrizas, que en un sentido amplio, representa una asociación mutualista, que incluye las relaciones tróficas de hongos con plantas "inferiores" y plantas aclorofílicas (Sasan y Bidochka, 2013). Más del 90 % de todas las especies de plantas que crecen en la tierra establecen relación simbiótica con hongos y dependen de esta interacción para sobrevivir (Behie y Bidochka, 2013). Estas relaciones con las plantas son formadas por hongos micorrizas o endófitos. Los hongos endófitos viven en los tejidos de las plantas; incluyendo las raíces, si bien algunos hongos como *Metarhizium* catalogado recientemente como endófito no habita las hojas (Behie y Bidochka, 2013; Behie *et al.*, 2015).

Ésta establecido que los simbioses fúngicos benéficos son capaces de transferir nutrientes limitantes del suelo, incluyendo fósforo, nitrógeno y sulfuro, a su planta hospedera y la transferencia es recíproca hacia el hongo con carbohidratos derivados de la planta (Kiers *et al.*, 2011). Por ejemplo, la salinidad en el suelo puede dañar las plantas a través de acumulación de especies reactivas de oxígeno durante la exposición prolongada al estrés. Las asociaciones endófitas pueden inducir la producción de antioxidantes tales como el glutatión, protegiendo a la planta del estrés salino (Kiers *et al.*, 2011).

Recientemente se ha clasificado a *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. como una nueva clase de hongos endófitos patógenos de insectos, los cuales son capaces de transferir nitrógeno obtenido desde los insectos que ellos infectan, directamente a las plantas simbioses y se ha encontrado que forman asociaciones endófitas en la rizósfera, como por ejemplo en la planta del frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Behie *et al.*, 2012; Sasan y Bidochka, 2012).

## Rizósfera

Hiltner en 1904 citado en Bais *et al.*, 2006, describe la "rizósfera" como una zona única y dinámica de interacción entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo. La rizósfera es una zona estrecha de tierra directamente influenciada por las secreciones de la raíz, es el sitio de interacciones complejas entre la plantas, bacterias, hongos, protistas,



nematodos e insectos (Bais *et al.*, 2006). Tales asociaciones son importantes para el ciclo de nutrientes como el ciclo del nitrógeno, ciclo del fósforo, funcionalidad del ecosistema y el secuestro de carbono. En particular algunos hongos son cruciales en el crecimiento y salud de las plantas, los hongos solubilizan los nutrientes del suelo y son antagonistas de patógenos de plantas, como fitopatógenos e insectos herbívoros (Liao *et al.*, 2014).

La rizósfera se caracteriza por potenciar la biomasa y la actividad microbiana. La interacción entre las raíces de la planta y los microorganismos está influenciada por varios factores, entre ellos, los exudados de raíz, especies de plantas, edad, pulverizaciones foliares, condiciones del suelo y condiciones ambientales (Sasan y Bidochka, 2012).

Los componentes de la rizósfera son las propias raíces, las cuales proveen a la planta de anclaje y los medios para adquirir agua, nutrientes y otras sustancias de crecimiento desde el suelo. A su vez las raíces proveen a los microorganismos con condiciones altamente favorables de crecimiento; entre ellas una estructura física para la colonización microbiana y la disponibilidad de compuestos fotosintetizados a la rizósfera como sacarosa, arabinosa, glucosa, galactosa, maltosa, entre otras (Sasan y Bidochka, 2012).

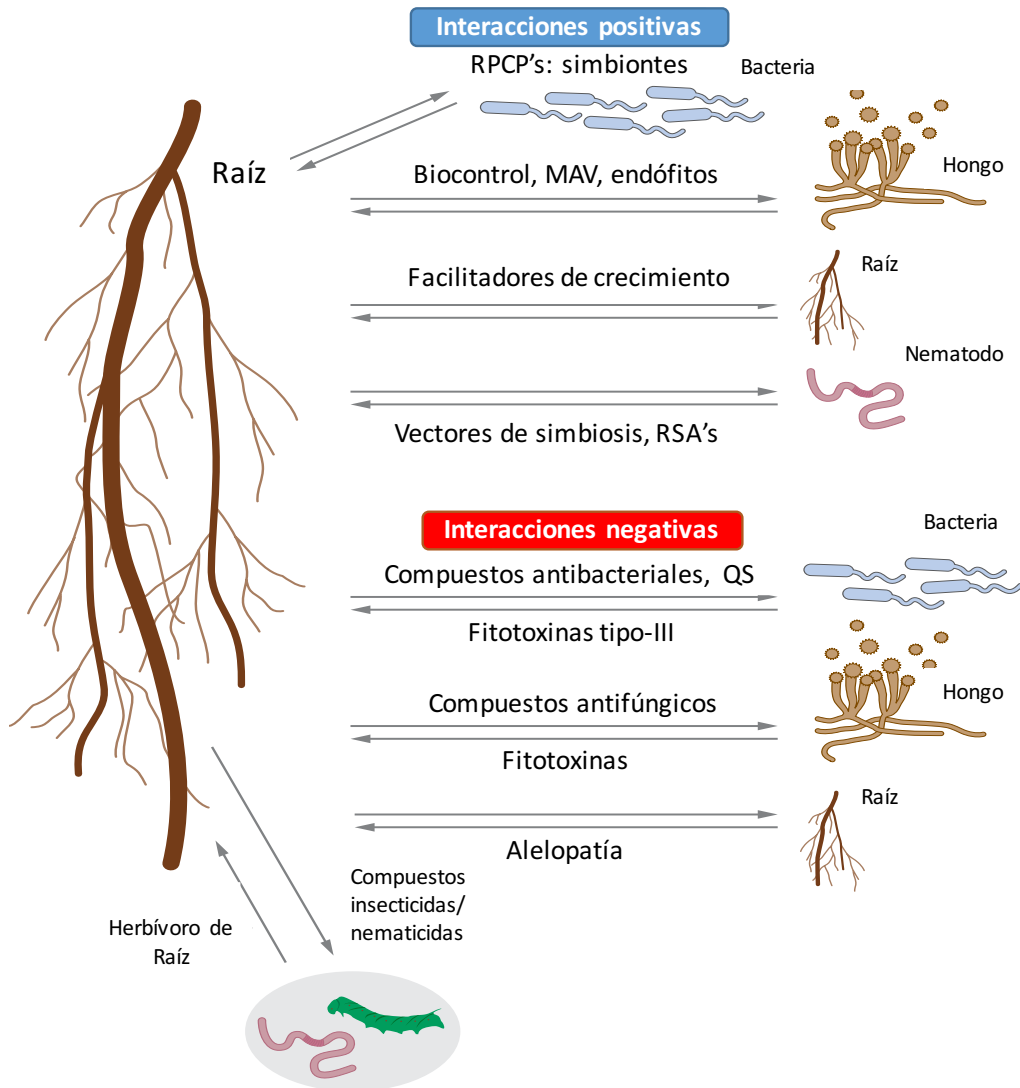
Las raíces de la planta continuamente producen y secretan compuestos dentro de la rizósfera. Los exudados de raíz incluyen la secreción de compuestos de bajo peso molecular como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, iones, oxígeno libre, vitaminas, purinas, nucleósidos, hormonas, metales inorgánicos, CO<sub>2</sub> y agua, además de pequeñas cantidades de una variedad de flavonoides, terpenoides y otros metabolitos secundarios que sirven como mediadores químicos en las interacciones microbio-planta, y compuestos de alto peso molecular como enzimas y mucílago (polisacáridos). Algunos de estos metabolitos pueden ser antibióticos, que confieren resistencia a patógenos bacterianos, o quimioattractores de las señales de la raíz, que específicamente inducen genes en el microorganismo, necesarios para establecer la asociación con plantas (Figura 4). Recientemente, un sesquiterpeno, el cual desencadena la ramificación de las hifas en hongos micorrizicos latentes, fue identificado en exudados de raíz de *Lotus japonicus* (Bais *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006).

Otro exudado de raíz es la sacarosa, el cual es uno de los principales carbohidratos producto de la fotosíntesis y ha sido detectado en altas concentraciones cerca de las puntas de las raíces. Varios hongos como *Thermomyces lanuginosus*, *Uromyces fabae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma virens* y *Metharizum robertsii* producen una invertasa, capaz de hidrolizar la sacarosa a monosacáridos, pudiendo utilizarlos como fuente de carbono (Liao *et al.*, 2013). En especies de *Glomus* y *Laccaria* hay una alta regulación de los transportadores de amonio durante la asociación con las raíces de la planta, proveyéndole nitrógeno (Behie *et al.*,





2013).



**Figura 4. Representación esquemática de las posibles interacciones mediadas por exudados de las raíces en la rizósfera.** Las interacciones positivas involucran las interacciones mediadas por exudados de con las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP's). Las raíces producen señales químicas que atraen a las bacterias e inducen quimiotaxis. Las interacciones positivas incluyen facilitadores de crecimiento o reguladores de crecimiento. Las interacciones negativas son debidas a exudados de las raíces como antimicrobianos, fitotoxinas, nematicidas e insecticidas, inhibiendo el crecimiento de los organismos benéficos que conforma la rizósfera. Las flechas en los paneles indican intercambio químico. Micorrizas arbusculares vesiculares (MAV), Resistencia sistémica adquirida (RSA's), Quorum-sensing (QS). Figura tomada y modificada de Bais *et al.*, 2006.



Las interacciones planta-microbio positivas influyen en el crecimiento de las plantas a través de una variedad de mecanismos que incluyen, la fijación de nitrógeno atmosférico, por diferentes clases de proteobacterias, incremento de la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Bais *et al.*, 2006). Además, las plantas pueden tomar el nitrógeno de la materia orgánica en descomposición, mediante los cadáveres de insectos o los desechos de estos. Algunas plantas han desarrollado distintas formas de obtención del nitrógeno, como las plantas carnívoras que usan sofisticadas trampas y señuelos para atrapar a los insectos presa, que digieren mediante enzimas que secretan para la obtención del nitrógeno proveniente del insecto o como el caso del hongo *Laccaria bicolor* que transfiere nitrógeno de cadáveres de insectos a los pinos blancos (Behie *et al.*, 2013). Mientras que en otros simbioses fúngicos, se ha observado que, en la colonización de la raíz de la planta, el hongo recibe carbón a cambio por nutrientes del suelo. Por ejemplo, en el simbionte *Ceratobasidium cornigerum*, provee a la orquídea (*Goodyera repens*) con nitrógeno en forma del aminoácido glicina a cambio de carbono en forma de azúcares (Javot *et al.*, 2011).

En el caso de las plantas, como en *Medicago truncatula* el gen *MtPt4*, codifica un transportador de fosfatos en la raíz de la planta durante su asociación con hongos micorrizicos (Javot *et al.*, 2011). Mientras que en los hongos micorrizicos, *Glomus mosseae* y *Glomus versiforme* se activan los genes *GmosPT* y *GvPT*, también de transportadores de fosfatos durante la asociación con la planta (Behie *et al.*, 2013), lo cual indica que durante la asociación, tanto la planta como los hongos responden con la síntesis de transportadores de fósforo, donde son beneficiados por este nutriente.

Como se ha mencionado antes, los hongos son importantes en las interacciones de la rizósfera, son el segundo grupo de microorganismos más prevalente en el suelo y ocasionalmente la biomasa de hongos excede la biomasa de las bacterias. Las interacciones entre plantas y hongos pueden ser benéfica, neutral o perjudicial. Los hongos patógenicos de raíz, saprofitos y micorrizas están entre los tres principales tipos de hongos en el suelo (Sasan y Bidochka, 2012). Otro tipo de hongos que interactúan en la rizósfera son los hongos endófitos, que son todos los hongos que habitan las plantas y puede colonizar tejidos internos sin causar daño aparente al hospedero. Los hongos endófitos se definen como un hongo que coloniza una planta sin causar síntomas de enfermedad visible en algún momento específico (Petrini, 1991; Schulz y Boyle, 2005). Los hongos endófitos pueden colonizar cualquier órgano desde las hojas a la raíz, y puede también ser específico de cada tejido (Tao *et al.*, 2008).

La colonización microbiana de la rizósfera es un importante primer paso en la patogénesis de microorganismos provenientes del suelo, y es crucial en la aplicación de microorganismos benéficos (Rudrappa *et al.*, 2008).



## El género *Metarhizium*; su papel en la rizósfera e interacción mutualista con las plantas

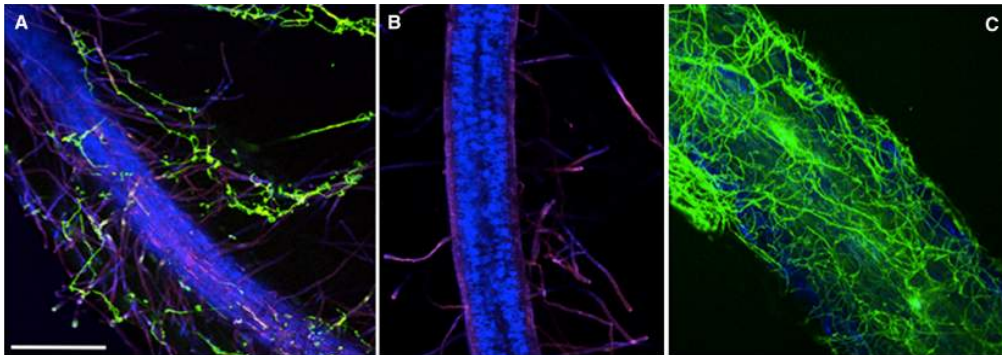
Los hongos del género *Metarhizium* han sido aislados de insectos infectados y el suelo de todos los continentes, excepto la Antártida, y han sido aislados cerca del círculo antártico. Aunque algunos aislados de estos hongos tienen una gama de hospederos restringido, el grupo es conocido por su habilidad de matar a un amplio espectro de insectos, incluyendo insectos en al menos siete órdenes. El nombre común de la enfermedad inducida por *Metarhizium* es “muscardina verde” o “muerte verde” basado en los conidios verdes incrustados sobre los cadáveres de insectos (Roberts y St. Leger, 2004).

*Metarhizium anisopliae* fue el primer hongo producido en masa alrededor del mundo y utilizado para el control de plagas de insectos (Roberts y St. Leger, 2004), por su alta especificidad de insecto hospedero, baja toxicidad a otros organismos, bajo impacto ambiental y menor desarrollo de la resistencia de los insectos, y a sus procesos de infección múltiple (Sasan y Bidochka, 2013). Este género también ha sido objeto de estudios a nivel molecular sobre tópicos fundamentales tales como virulencia y la especificidad del hospedero (Roberts y St. Leger, 2004).

El mecanismo de infección usado por *Metarhizium* es relativamente bien entendido (Tao *et al.*, 2004). Bajo las condiciones apropiadas, el conidio del hongo se adhiere por mecanismos hidrofóbicos no específicos a la superficie del insecto (Boucias *et al.*, 1988). Una vez que se adhiere a cutícula del insecto, el conidio germina y la hifa penetra la cutícula del insecto (St. Leger *et al.*, 1986; Charnley y St. Leger, 1991).

Se ha considerado que *Metarhizium* vive en el suelo y en estado de vida patogénico hacia el insecto (Roberts y Humber, 1981). Sin embargo, en recientes estudios acerca de *Metarhizium* spp., se encontró que puede también estar asociado a la rizósfera de las plantas, teniendo así otro estilo de vida diferente a lo mencionado anteriormente (Hu y St Leger, 2002).

Hu y St. Leger en 2002, demostraron la habilidad de la cepa ARSEF 1080 de *Metarhizium anisopliae* de colonizar la rizósfera, usando la expresión de GFP en la cepa (Figura 5). Este hongo patógeno de insectos está íntimamente asociado a las raíces de las plantas, reside como un colonizador endófito en raíces de frijol, además de este estudio se observó la proliferación de los pelos radicales de la raíz principal de la plántula (Milner y Hunter, 2001). Durante esta asociación endófito de *Metarhizium* con la planta, la hifa penetra en la superficie de las células de la raíz. Para alcanzar la pared celular epidérmica, el hongo secreta enzimas hidrolíticas como las pectinasas (Hu y St Leger, 2002).

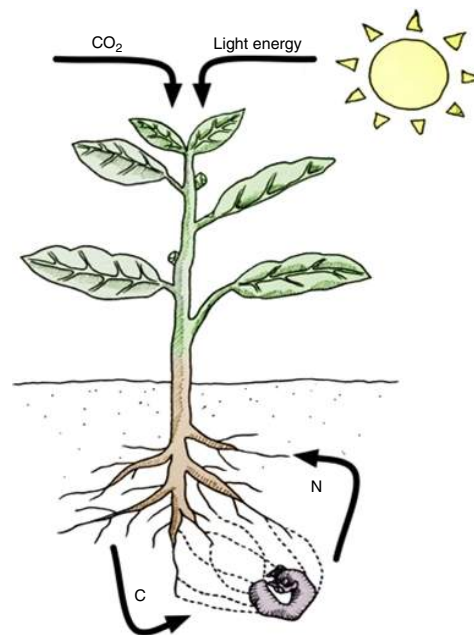


**Figura 5. Colonización de la raíz del pasto varilla y el frijol por *Metarhizium*.** **A)** Sección de la raíz de pasto varilla (Switchgrass) tratado con *M. robertsii*, muestra asociación de la hifa expresando GFP. **B)** Sección de la raíz control, el azul es la autofluorescencia de la planta. **C)** Toda la sección de la raíz mostrando el crecimiento de *M. robertsii* sobre la superficie de raíz de frijol 10 días después de la germinación. Tomada de St. Leger *et al.*, 1996.

En el 2012, Behie *et al.* determinaron que el hongo *M. robertsii* trasloca nitrógeno del insecto infectado hacia la planta de frijol o al pasto de varilla usando larvas de *Galleria mellonella* utilizando  $^{15}\text{N}$  (Figura 6). Observaron que después de 14 días en presencia de *Metarhizium*, el nitrógeno derivado del insecto constituía de un 28 % a 32 % del contenido de nitrógeno en el frijol y el pasto varilla, respectivamente; esto representa significativamente una gran incorporación de  $^{15}\text{N}$ .

Además, en trabajos recientes de 2017, Behie *et al.* observaron que la planta le transfiere a *Metarhizium* compuestos carbonados, los cuales son aprovechados para sintetizar sus propios azúcares. En este estudio para medir esta interacción se utilizó  $^{13}\text{CO}_2$ , en cámaras cerradas con plantas, para determinar la transferencia de carbono entre la planta y *Metarhizium*. El carbón marcado fue rastreado a través de la planta y en los azúcares producidos dentro del hongo. Se encontró que las raíces colonizadas por *Metarhizium* reciben carbón fijado fotosintéticamente desde la planta y que *Metarhizium* es capaz de metabolizar este carbono para su uso en los procesos fúngicos. Esto sugiere que los nutrientes transferidos entre los simbioses son recíprocos. No se ha demostrado aún que otros nutrientes, tales como el fósforo o sulfitos provenientes de las plantas, se reciclen a través de *Metarhizium* (Behie *et al.*, 2012).





**Figura 6. Asociación mutualista de *Metarhizium* con las plantas.** Transferencia de nitrógeno a cambio de carbono; *Metarhizium* infecta y mata los insectos provenientes del suelo. De la muerte del insecto, el micelio del hongo se asocia endófitamente con las raíces de la planta, donde ocurre la translocación de nitrógeno, mientras que la planta absorbe  $\text{CO}_2$ , el cual mediante la fotosíntesis produce azúcares que son excretadas a la rizósfera y son aprovechadas por el hongo *Metarhizium*. Tomada de Behie *et al.*, 2017.

En el proceso de colonización de la rizósfera por *Metarhizium* intervienen diferentes factores, por ejemplo *M. robertsii* expresa diferencialmente dos genes de adhesinas, MAD1 y MAD2. MAD1 es usada para adhesión a la cutícula del insecto y MAD2 contribuye a la adhesión a la planta (Behie *et al.*, 2017). Estudios sobre la expresión de MAD1 y MAD2 en *Saccharomyces cerevisiae* permite que las células de levadura se adhieran a la cutícula del insecto y la superficie de las plantas, respectivamente, corroborando la función de los genes de las adhesinas (Wang y St. Leger, 2007).

Para todos los microorganismos que habitan la rizósfera, la competencia es vital, y para *Metarhizium* un transportador de oligosacáridos; transportador de rafinosa de *Metarhizium* (*MRT*, por sus siglas en inglés), es importante para la competencia de *Metarhizium* en la rizósfera, único en hongos filamentosos ascomicetos y basidiomicetos. Se comprobó que la disrupción del gen *MRT* no tiene efecto en la virulencia al insecto, pero la competencia en la rizósfera de *M. robertsii* fue muy reducida (Sasan y Bidochka, 2012). Como se mencionó anteriormente, Liao *et al.* en 2013, reportaron que *M. robertsii* produce una invertasa extracelular (*Mrlnv*) sobre las raíces de las plantas. Demostrando que la mutante nula del



gen ( $\Delta Mrlnv$ ) reduce su crecimiento de *M. robertsii* en sacarosa y en exudados de raíz, esto sugiere que el metabolismo de azúcares está relacionado en la competencia de la rizósfera de diferentes especies de *Metarhizium*.

En 2014, Liao *et al.* observaron que *Metarhizium* en interacción con plántulas de maíz puede aumentar el crecimiento de éstas y mejorar el rendimiento de las mazorcas. Los autores hacen mención que todas las cepas utilizadas en dicho estudio podrían estar produciendo fitohormonas promotoras del crecimiento en las raíces. En este año Liao *et al.*, demostraron que una cepa de *M. robertsii* produce ácido 3-indolacético, que es una fitohormona tipo auxina que promueve el crecimiento y proliferación de las raíces de las plantas.

### Aislamiento de *Metarhizium*

Usualmente los aislados de *Metarhizium* son obtenidos de cadáveres de insectos; sin embargo, recientemente fueron recuperado desde raíces de varios sistemas de especies de plantas (Steinwender *et al.*, 2015). El estudio de estos hongos se ha basado en el aislamiento de cadáveres de insectos y del suelo. Ambos métodos y el uso de medios selectivos han sido utilizados para el aislamiento del hongo entomopatógeno del suelo (Shin *et al.*, 2010).

El uso de insectos carnada es un método de detección muy sensible y el hongo entomopatógeno puede ser aislado selectivamente. Sin embargo, algunas especies de insectos tienen un patógeno fúngico específico y solo se aíslan aquellas cepas con capacidad de infectar al insecto usado. En contraste el medio selectivo para hongos entomopatógeno tiene algunas ventajas para la colección en masa de hongos y la obtención de información cuantitativa sobre la población de hongos entomopatógenos que habitan los ecosistemas. En este sentido, varios medios selectivos se han desarrollado para la colección en masa de hongos entomopatógeno provenientes del suelo. Fungicidas (como el Oxgall, sulfato cúprico, cloruro de cobre (II), Benomyl y dodina [monoacetato de *N*-dodecilguanidina]) y antibióticos (como el cloranfenicol, tetraciclina y estreptomycin) han sido usados por separado o en combinación, para aislar hongos entomopatógenos en medio selectivo (Fernandes *et al.*, 2010).

En la búsqueda de medios selectivos, Tae-Young *et al.* en 2010, compararon varios medios con cloruro de cobre (II) y con dodina, determinando, que el medio selectivo con dodina es más selectivo para hongos de crecimiento lento. Además, se determinó que 64 % de los hongos identificados son hongos entomopatógenos. Se han utilizado medios a base de PDA enriquecido con extracto de levadura, suplementado con dodina y gentamicina, este medio provee un sustrato eficiente para la selección de entomopatógenos de contaminantes ambientales. Sin embargo, *M. acridum* es más susceptible al fungicida dodina que otras



especies de *Metarhizium* (Rangel *et al.*, 2010). En el trabajo de Fernandes *et al.* en 2010, desarrollaron el medio CTC (cloranfenicol, Tianbendazol y ciclohexamina) para el aislamiento de *M. acridum*, en este estudio se determinó que *M. acridum* crece y esporula mejor en medio CTC que en medio con dodina, además determinaron que *M. robertsii* y *Beauveria brongniartii* tienden a ser más sensibles a dodina que *M. brunneum* y *B. bassiana*.

Por lo tanto, el aislamiento de *Metarhizium* proveniente del suelo, mediante medios selectivos es un método eficiente y rápido, que puede ser cuantitativo, sin aislar solo los hongos con hospederos de insectos específicos.

### Caracterización molecular de *Metarhizium*

En 2000 Driver *et al.* y en el 2005, Huang *et al.* derivaron filogenias de especies de *Metarhizium* infiriéndose exclusivamente en el análisis de genes ribosomales (ITS), lo cual tiene baja resolución resolviendo los linajes de *Metarhizium*. En el 2006, Bischoff *et al.* analizaron la longitud total de la secuencia de DNA del factor de elongación 1 (EF-1 $\alpha$ ) y secuencias parciales de dos subunidades de RNA polimerasa II (RPB1 y RPB2). Este estudio demostró ser eficiente y provee una herramienta más sensible y robusta para identificar linajes de *Metarhizium*. En el 2009 Bischoff *et al.* clarificaron la taxonomía y filogenia del complejo de *Metarhizium anisopliae* que incluyó todas las cuatro variedades reconocidas hasta ese entonces de *Metarhizium anisopliae*, así como *Metarhizium guizhouense*, *Metarhizium pingshaense* y *Metarhizium taii*, además examinaron la morfología de colonias y conidios de los aislados de todos los linajes inferidos. Identificaron dos principales clados, el MGT en el cual está; *M. majus*, *M. guizhouense* y *M. taii*, mientras que en el clado PARB se encuentra; *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. brunneum* mientras que *M. lepidotae*, *M. acridum*, *M. globosum*, *M. flavoviride* y *M. frigidum* están fuera de los clados. Además, para la caracterización de *Metarhizium* se han usado los marcadores de microsatélites, o repeticiones de secuencias simples (SSR), ya que proveen una herramienta eficiente de alta resolución para el genotipo multilocus (Enkerli y Widmer, 2010). Enkerli y Widmer en 2010, Oulevey *et al.* en 2009 desarrollaron y validaron marcadores SSR para la identificación de genotipos multilocus (MLG) de *M. anisopliae*. Un subconjunto de 14 de estos marcadores permitió a Steinwender *et al.* en 2014, identificar 13 únicos MLG para cuatro especies de *Metarhizium* en ambientes de suelo en un ecosistema en Dinamarca.

Bischoff *et al.* en 2009, mencionan que el EF-1 $\alpha$  es suficiente para una resolución de especies de *Metarhizium* y es actualmente el locus más útil para el diagnóstico de grupos terminales en la identificación de especies de los hongos de *Fusarium* y *Trichoderma* (Geiser *et al.*, 2004). Para una resolución total de la genealogía de *Metarhizium*, en la cual no solo se pueda determinar la especie si no también diferencias entre la población, es fundamental



el uso de varias herramientas genómicas, como el análisis de los marcadores de SSR en combinación con el análisis de EF-1 $\alpha$ , esto proporciona una buena resolución de la genealogía de este hongo entomopatógeno.

CONFIDENCIAL



## HIPÓTESIS

Debido a las diferencias marcadas entre los climas, altitudes y tipos de suelo del estado de Guanajuato se generan micro ecosistemas. En estos micro ecosistemas no solo la biodiversidad de animales y plantas aumenta sino también de microorganismos presentes en el suelo. Por lo tanto, es posible aislar del suelo de los micro ecosistemas del estado de Guanajuato una gran biodiversidad del hongo *Metarhizium*, con el potencial biotecnológico para una agricultura sustentable.

CONFIDENCIAL



## OBJETIVO GENERAL

Caracterización de aislados del hongo *Metarhizium* provenientes del norte del estado de Guanajuato con el potencial para promover el crecimiento vegetal.

### Objetivos específicos

1. Aislamiento de cepas de *Metarhizium* spp. provenientes de las áreas naturales protegidas del norte del estado de Guanajuato.
2. Caracterización molecular de los aislados.
3. Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad.
4. Caracterización del potencial para promover el crecimiento vegetal.

CONFIDENCIAL



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas utilizadas

El género, especie y cepas empleadas en este estudio se muestran en la Tabla 1, pertenecientes a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato.

Tabla 1. Cepas de *Metarhizium* y *Escherichia coli* usadas en este trabajo

Cepa	Género y Especie	Características	Referencia
<b>CARO4</b>	<i>Metarhizium robertsii</i>	Cepa aislada del complejo <i>Phyllophaga</i> spp. (Plaga de Maíz), con genotipo silvestre.	Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato, México
<b>CARO7</b>	<i>Metarhizium brunneum</i>	Cepa aislada del insecto <i>Spodoptera frugiperda</i> (Plaga de Maíz), con genotipo silvestre.	
<b>CARO11</b>	<i>Metarhizium brunneum</i>	Cepa aislada del insecto <i>Phyllophaga</i> sp. (plaga del Maíz), con genotipo silvestre.	
<b>CARO12</b>	<i>Metarhizium brunneum</i>	Cepa aislada del insecto <i>Schistocerca piceifrons</i> (plaga del sorgo), con genotipo silvestre.	
<b>CARO19</b>	<i>Metarhizium brunneum</i>	Cepa aislada del insecto <i>Gerageus senilis</i> (Plaga de Maíz), con genotipo silvestre.	

Tabla 1 (continuación). Cepas de *Metarhizium* y *Escherichia coli* usadas en este trabajo

Cepa	Género y Especie	Características	Referencia
E6	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Cepa aislada del arácnido <i>Rhipicephalus microplus</i> (Garrapata de Ganado).	Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Porto Alegre, Brasil (Schrank <i>et al.</i> , 2010).
ARSEF23	<i>Metarhizium robertsii</i>	Cepa aislada del insecto <i>Conoderus</i> sp. (Plaga de Sorgo).	Colección de Cultivos Fúngicos Entomopatógenos del Servicio de Investigación Agrícola perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA – ARSEF).
ARSEF2575	<i>Metarhizium robertsii</i>	Cepa aislada del insecto <i>Curculio caryae</i> (Plaga de la Nuez).	
ARSEF7486	<i>Metarhizium acridum</i>	Cepa aislada del insecto <i>Ornithacris cavroisi</i> (Plaga de Sorgo).	
ARSEF252	<i>Beauveria bassiana</i>	Cepa aislada del insecto <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Plaga de papa).	
DH5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i>	Genotipo: F- $\emptyset$ 80 $\Delta$ lac $\Delta$ ZM15 $\Delta$ (lacZYA- argF) U169 reacA1 endA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> , m <sub>k</sub> +) 18oa supE44 $\lambda$ -thi-1 gyrA96 relA1.	





Se utilizaron, además todos los aislados obtenidos en este trabajo (Tabla 2). Se muestra el total de los aislados obtenidos, su especie, lugar donde fue aislado y si tienen la capacidad de conidiar en fotoperiodo u oscuridad.

La nomenclatura de los aislados, la identificación de la especie y la determinación de la capacidad de conidiar en fotoperiodo u oscuridad, se muestra con detalle en la sección de resultados.

Tabla 2. Aislados obtenidos en este trabajo

	Aislado	Especie	Lugar donde se aisló	Conidia en fotoperiodo	Conidia en oscuridad
1	PCP1	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
2	PCP2	<i>M. robertsii</i>	Las Palomas	Si	No
3	PCP7-1	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
4	PCP7-2	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
5	PCP7-2.1	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
6	PCP10-1	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
7	PCP10-1.1	<i>M. robertsii</i>	Las Palomas	Si	Si
8	PCP10-1.2	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	No	Si
9	PCP10-1.5	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
10	PCP10-5	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
11	PCP41	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
12	PCP42-1	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
13	PCP42-2	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	No
14	PCP42-3	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	No
15	PCP42-4	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	Si
16	PCP42-5	<i>M. brunneum</i>	Las Palomas	Si	No
17	PCP42-6	<i>M. anisopliae</i>	Las Palomas	Si	Si
18	LCP1CV	<i>M. brunneum</i>	Cuenca de la Esperanza	Si	Si
19	LCP5	<i>M. guanajuatense</i>	Cuenca de la Esperanza	Si	Si
20	LCP13	<i>M. palomense</i>	Cuenca de la Esperanza	Si	No
21	LCP16	<i>M. guanajuatense</i>	Cuenca de la Esperanza	Si	Si
22	LCP29-1.1	<i>M. brunneum</i>	Cuenca de la Esperanza	Si	Si
23	LCP29-1.2	<i>M. brunneum</i>	Cuenca de la Esperanza	Si	No
24	LCP29-2	<i>M. brunneum</i>	Cuenca de la Esperanza	Si	No
25	LCP29-2.1	<i>M. brunneum</i>	Cuenca de la Esperanza	Si	Si
26	SR7	<i>M. brunneum</i>	Santa Rosa	Si	Si
27	SR9CV	<i>M. brunneum</i>	Santa Rosa	Si	No
28	SR19	<i>M. pingshaense</i>	Santa Rosa	Si	Si
29	SR23-1	<i>M. brunneum</i>	Santa Rosa	Si	No
30	SR23-2	<i>M. brunneum</i>	Santa Rosa	Si	Si



Tabla 2 (continuación). Aislados obtenidos en este trabajo

	Aislado	Especie	Lugar donde se aisló	Conidia en fotoperiodo	Conidia en oscuridad
31	CU3	<i>M. robertsii</i>	Cubilete	Si	Si
32	CU2-4	<i>M. robertsii</i>	Cubilete	Si	Si
33	CU11CV	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	Si
34	EC7	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	Si
35	EC25	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	Si
36	EC26	<i>M. robertsii</i>	Cubilete	Si	Si
37	EC13-1	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	Si
38	EC13-2	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	No
39	ECLC2	<i>M. robertsii</i>	Cubilete	Si	No
40	ECLC5	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	No
41	ECLC11-1.1	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	Si
42	ECLC11-1.2	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	No
43	ECLC11-1.3	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	No
44	ECLC11-2	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	Si
45	ECLC11CV	<i>M. brunneum</i>	Cubilete	Si	Si
46	ECLC14	<i>M. robertsii</i>	Cubilete	Si	Si
47	AT1-1	<i>M. robertsii</i>	Atarjea	Si	No
48	AT1-2	<i>M. robertsii</i>	Atarjea	Si	Si
49	AT3	<i>M. brunneum</i>	Atarjea	Si	No
50	AT4	<i>M. brunneum</i>	Atarjea	Si	Si
51	AT9	<i>M. brunneum</i>	Atarjea	Si	Si
52	AT14-1	<i>M. robertsii</i>	Atarjea	Si	No
53	AT14-2	<i>M. robertsii</i>	Atarjea	Si	No
54	AT23-1	<i>M. brunneum</i>	Atarjea	Si	Si
55	AT23-2	<i>M. brunneum</i>	Atarjea	Si	Si
56	AT23-3	<i>M. brunneum</i>	Atarjea	Si	Si
57	AT25	<i>M. robertsii</i>	Atarjea	Si	No
58	STC4	<i>M. brunneum</i>	Sta. Catarina	Si	Si
59	STC8	<i>M. brunneum</i>	Sta. Catarina	Si	Si

## Plantas utilizadas

### Semillas de sorgo

Se empleó la variedad de *Sorghum bicolor* (sin. *Sorghum vulgare*) CB-112 (Semillas Berentsen®) del lote 101865 con el ciclo de producción 201 producido en Texas, USA., tratado con Storcide™ y Signet® 480 FS + Clotianidina. Estas semillas producen una panoja



grande semicompacta, con una planta de 1,40 a 1,50 m de alto, adaptada al estado de Guanajuato, y es de las más compradas por los productores guanajuatenses.

Las semillas de *Sorghum vulgare* fueron esterilizadas por medio de gas cloro haciendo reaccionar 100 mL de hipoclorito de sodio (Cloralex®) y 3,5 mL de ácido clorhídrico concentrado en un desecador durante 16 horas, este procedimiento se realizó dentro de la campana de extracción.

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron utilizados para el aislamiento, crecimiento y mantenimiento del hongo *Metarhizium*, la germinación de las semillas de las plantas, crecimiento de *E. coli* y las interacciones entre *Metarhizium*-planta. Todos los medios se esterilizaron previamente en autoclave durante 20 min, 121 °C a 2 atm de presión.

#### Medio dodina (Medio de selección para los aislados *Metarhizium*)

Este medio contiene por cada litro: 40 g del medio rico papa dextrosa agar (PDA) Bioxon®, 1 g de extracto de levadura, 0,5 g de cloranfenicol, 0,25 g de cicloheximida y 0,15 g del principio activo monoacetato de duodecilguanidinio o dodina del fungicida comercial Syllit® flow .

#### Medio dodina con cristal violeta

Al medio dodina se le adiciono 0,0025 g/L de cristal violeta.

#### Medio dodina para resiembra de los aislados de *Metarhizium*

Este medio contiene por cada litro: 40 g del medio rico papa dextrosa agar (PDA) Bioxon®, 1 g de extracto de levadura, 0,5 g de cloranfenicol, 0,25 g de cicloheximida y 0,025 g del principio activo monoacetato de duodecilguanidinio o dodina del fungicida comercial Syllit® flow. Adicionando cuatro antibióticos; kanamicina (100 µg/µL), ampicilina (150 µg/µL), carbenicilina (100 µg/µL), cefotaxima (100 µg/µL).

#### M-100 con dos fuentes de nitrógeno (M100-2N)

Este medio contiene por cada litro: 10 g de dextrosa, 3 g de nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), 1,8 g de nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), 60 mL de solución de sales M-100, 15 g de agar.



### Solución de sales M-100

Esta solución contiene por cada litro: 16 g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 4 g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 8 g de cloruro de potasio (KCl), 2 g de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 1 g de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), 8 mL de solución de elementos traza M-100.

### Solución de elementos traza M-100

Este medio contiene por cada litro: 60 mg de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 140 mg de cloruro de manganeso tetrahidratado ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 400 mg de cloruro de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ), 40 mg de molibdato de sodio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 100 mg de cloruro de hierro III ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 400 mg de sulfato de cobre II pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).

### Medio agar-agua

Agar bacteriológico (BDBioxon®) 15 g en 1L de agua destilada

### Medio PDA

Medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) deshidratado (BDBioxon®) 39 g en 1L de agua destilada

### Medio YPD-2

Este medio contiene por cada litro: 2 g de extracto de levadura, 10 g de peptona de caseína y 20 g de dextrosa.

### Medio Luria-Bertani (LB)

Este medio contiene por cada litro: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio (NaCl). Cuando se requirió medio sólido se agregaron 20 g de agar bacteriológico.



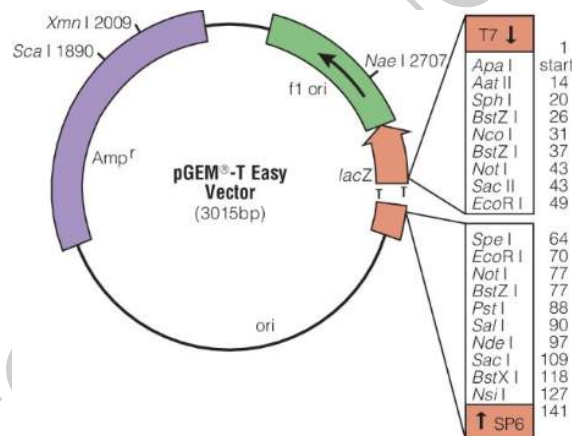
Medio LB-Xgal-IPTG, para la selección de recombinantes en los que se interrumpe la región 5' del gen de la Beta-Galactosidasa

Este medio se utilizó en experimentos de transformación de *E. coli* (Sambrook y Russell, 2001), el medio LB se suplementó con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL y en cada caja se espatularon 40 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-indolil-β-Dgalactopiranosido) al 2% p/v en *N,N*-dimetil-formamida y 4 µL de IPTG (isopropil- β-Dtiogalactopiranosido) 100 mM.

### Plásmidos empleados

#### Vector pGEM®-T Easy

Se empleó el vector pGEM®-T Easy (Figura 7) de la casa comercial PROMEGA para realizar la clonación de los productos de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



**Figura 7. Mapa del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy y puntos de referencia de la secuencia.** El vector contiene timina en los extremos que facilita la inserción del fragmento de interés, múltiples sitios de restricción, los promotores de la RNA polimerasa T7 y SP6 flanqueando el sitio múltiple de clonación, un origen de replicación (fi y ori) y un gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>). Obtenido de la pagina <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>



## Oligonucleótidos empleados

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Descripción	Secuencia (5'-3')
<b>EF1T</b>	Directo, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 790 pb del gen del Factor de Elongación 1 $\alpha$ (Bischoff <i>et al.</i> , 2006).	ATGGGTAAGGAAGACAAGAC
<b>EF2T</b>	Reverso, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 790 pb del gen del Factor de Elongación 1 $\alpha$ (Bischoff <i>et al.</i> , 2006).	GGAAGTACCAGTGATCATGTT
<b>Bt1F</b>	Directo, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 700 pb del gen de la beta tubulina (Bischoff <i>et al.</i> , 2009).	GGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCC
<b>Bt1R</b>	Reverso, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 700 pb del gen de la beta tubulina (Bischoff <i>et al.</i> , 2009).	CAGCCATCATGTTCTTAGGGTC
<b>frPB2-5F</b>	Directo, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 1200 pb del gen de la segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II (Bischoff <i>et al.</i> , 2006).	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG
<b>RPB2-7cR</b>	Reverso, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 1200 pb del gen de la segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II (Bischoff <i>et al.</i> , 2006).	CCCATRGTGTYTTRCCCAT
<b>ITS-1</b>	Directo, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 580 pb de la región ITS (Montalva <i>et al.</i> , 2016).	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
<b>ITS-4</b>	Reverso, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 580 pb de la región ITS (Montalva <i>et al.</i> , 2016).	TCCTCCGCTTATTGATATGC



Tabla 3 (continuación). Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Descripción	Secuencia (5'-3')
<b>NS1</b>	Directo, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 1100 pb del gen 18S (SSU) (Lee <i>et al.</i> , 2015).	GTAGTCATATGCTTGCTC
<b>NS4</b>	Reverso, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 1100 pb del gen 18S (SSU) (Lee <i>et al.</i> , 2015).	CTCCGTC AATTCCTTAAG
<b>LROR</b>	Directo, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 900 pb del gen 28S (LSU) (Lee <i>et al.</i> , 2015).	ACCCGCTGA ACTTAAGC
<b>LR5F</b>	Reverso, utilizado para amplificar un fragmento de aproximadamente de 900 pb del gen 28S (LSU) (Lee <i>et al.</i> , 2015).	GCTATCCTGAGGGAAAC
<b>METPR1</b>	Directo, utilizado para la primera amplificación de la PCR anidada del fragmento del gen de PR1A (Leal <i>et al.</i> , 1997).	CACTCTTCTCCAGCCGTTCC
<b>METPR4</b>	Reverso, utilizado para la primera amplificación de la PCR anidada del fragmento del gen de PR1A (Leal <i>et al.</i> , 1997).	GTAGCTCAACTTCTGCACTC
<b>METPR2</b>	Directo, utilizado para la segunda amplificación de la PCR anidada del fragmento del gen de PR1A de 1200 pb (Leal <i>et al.</i> , 1997).	AGGTAGGCAGCCAGACCGGC
<b>METPR5</b>	Reverso, utilizado para la segunda amplificación de la PCR anidada del fragmento del gen de PR1A de 1200 pb (Leal <i>et al.</i> , 1997).	TGCCACTATTGGCCGGCGCG



## Aislamiento de *Metarhizium*

### Colecta de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron colectadas de las áreas naturales protegidas del norte del estado de Guanajuato. Se llegó a la zona núcleo del área y se delimitó un transecto, se tomaron muestras aproximadamente cada 100 m en dirección de los cuatro puntos cardinales, en las cuales se tomó aproximadamente 5 g de suelo de la rizósfera de plantas aparentemente sanas, hasta 10 cm de profundidad, las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico hermético para su posterior traslado al laboratorio.

Se pesó un gramo de la muestra de suelo en tubos de 15 mL conteniendo una solución de Tritón (Sigma) al 0,01 %, se homogeneizó en agitador Vortex y se tomó 100  $\mu$ L de la solución y se inoculó directamente en cajas Petri por duplicado con cada uno de los medios de selección para *Metarhizium* (Beilharz *et al.*, 1982).

### Condiciones de crecimiento e identificación de *Metarhizium*

Cada muestra se incubó de 20 a 25 días a temperatura ambiente, con luz natural, hasta observar conidiación de las colonias. Los aislados de *Metarhizium* fueron identificados a nivel de género por sus características morfológicas de la colonia (color verde y consistencia terrosa) y conidios (ovalados cilíndricos).

### Obtención de los cultivos axénicos de *Metarhizium*

Se procedió a tomar una muestra del aislado de *Metarhizium* y pasarlo a un medio fresco de resiembra con palillos planos mediante estriado, se incubó a 26 °C con foto periodo 16 horas luz/ 8 horas oscuridad hasta observar conidiación de los aislados.

Se tomó con un palillo plano estéril conidios de la muestra y se colocó en 1 mL de Tritón X-100 al 0,01 % se realizó la cuenta de los conidios mediante un hemocitómetro (Hausser Scientific®), se ajustó la concentración a 1000 conidios/mL, se tomaron 50  $\mu$ L de la solución y se inocularon en medio de resiembra para obtener monoclonias. Se incubaron a 26 °C con foto periodo 16 horas luz/8 horas oscuridad hasta observar conidiación.

### Obtención de conidios

Los aislados de *Metarhizium* a utilizar en los experimentos se crecieron en medio M-100 2N a 26 °C de 10-14 días. Para colectar los conidios se utilizó una solución de Tritón X-100 al 0,1 % (Sigma- Aldrich®) se tomaron los conidios crecidas en caja Petri con una pipeta Pasteur





estéril, se filtró con malla de fibra sintética para eliminar micelio y se realizaron 3 lavados con 30 Tritón X-100 al 0.01% y se determinó la concentración de conidios/mL mediante la cuenta con hemocitómetro (Hausser Scientific®)

#### Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad

En cajas Petri con medio PDA se inoculó una gota en el centro de 50  $\mu$ L de una solución de 10,000 conidios de cada aislado individualmente por duplicado, la gota se dejó secar. Uno de los duplicados se coloca a incubación en foto periodo 16 h luz/8 h oscuridad mientras que el otro se envolvió en papel aluminio evitando así el paso de la luz (total oscuridad). Ambas muestras se incubaron a 26 °C durante 14 días.

Se observó la capacidad de cada aislado para conidiar en oscuridad. Posteriormente, se tomaron fotografías con luz natural con cámara fotográfica (8 MP, 3264x2448 pixels).

#### Caracterización del potencial para promover el crecimiento vegetal

##### Bioensayos para la determinación del porcentaje de germinación

En una caja Petri con medio agar-agua se colocaron 10 semillas en línea recta de *Sorghum vulgare*, a 2 cm de distancia aproximadamente se inoculó una línea con 50  $\mu$ L de solución de conidios con  $1 \times 10^8$  conidios/mL de cada aislado individualmente. Se incubaron a 28 °C durante 14 días, con foto periodo 12 horas luz/12 horas oscuridad. Se determinó el porcentaje de germinación.

#### Métodos de genética y biología molecular

##### Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico se inocularon  $1 \times 10^6$  conidios/mL de cada aislado individualmente en 20 mL de medio YPD-2 con 20  $\mu$ L de cloranfenicol (0,1 g/mL). Se agito a 180 rpm por 48 h.

Se obtiene el micelio por filtración al vacío utilizando un papel filtro Whatman 3 mm y un embudo Buchner, el micelo se guardó en papel aluminio a -70 °C. Al tener el micelio congelado la extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y Russel (2001), con algunas modificaciones como se describe a continuación: Se tomó un fragmento pequeño de micelio y se trituró en un mortero de porcelana (previamente lavado y esterilizado con calor seco, posteriormente enfriado a -70 °C) con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo blanco fino el cual se colocó con una espátula a un tubo Eppendorf que



contenía 400  $\mu\text{L}$  de NTES (NaCl 0,1 M, Tris pH 8, EDTA 0,001M y SDS al 1% v/v). El tubo se agitó mediante un agitador tipo vortex hasta obtener una mezcla uniforme de color blanco y se colocó en hielo. El tubo se centrifugó por 10 min a 28000  $xg$  a 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5417R. Después se recuperaron 350  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, se añadió 2  $\mu\text{L}$  de RNAsa y se incubó por 5 minutos a 37 °C. Se precipitó añadiendo 20  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M y 400  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Enseguida se centrifugó por 5 minutos a 2700  $xg$  a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Se adicionó 1000  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Nuevamente se centrifugó por 5 min a 960  $xg$  y se desechó el sobrenadante. Por último, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió el DNA obtenido en 50  $\mu\text{L}$  de regulador TE.

### Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la reacción de amplificación de los fragmentos del gen del Factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) de aproximadamente 790 pb se utilizó la siguiente mezcla de reacción para todos los aislados individualmente: 1  $\mu\text{L}$  de DNA genómico, 1  $\mu\text{L}$  de oligo directo EF-1 $\alpha$  (Tabla 3), 1  $\mu\text{L}$  de oligo reverso EF2T (Tabla 3), 15  $\mu\text{L}$  de JumpStar DNA taq Polymerase (Sigma-Aldrich) y 13  $\mu\text{L}$  de agua grado HPLC para completar un volumen de 30  $\mu\text{L}$ . La mezcla se sometió a una reacción de amplificación bajo las siguientes condiciones en un termociclador ProFlex™ PCR System de applied Biosystem™. Las condiciones empleadas en la reacción fueron las siguientes: Desnaturalización a 95 °C por 5 min, durante 40 ciclos el siguiente programa; desnaturalización a 95 °C por 20 s, 1 min de alineamiento a 55 °C y una extensión por 1:30 min a 72 °C, 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min.

Para aquellos aislados que no se pudo identificar la especie mediante el factor de elongación 1  $\alpha$ , además se amplificaron fragmentos de los genes: Beta Tubulina ( $\beta\text{T}$ ), la segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II (RPB2), el gen de la región ITS, un fragmento del gen 18S (SSU), un fragmento del gen 28S (LSU) y un fragmento del gen que codifica para la proteasa PR1A (Tabla 3). Las condiciones empleadas en la reacción fueron las siguientes.

**Beta Tubulina ( $\beta\text{T}$ ):** Mismas condiciones de reacción empleadas en el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ).

**Segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II (RPB2):** Desnaturalización a 95 °C por 5 min, durante 30 ciclos el siguiente programa; desnaturalización a 95 °C por 20 s, 2 min de alineamiento a 55 °C y una extensión por 2 minutos a 72 °C, 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min.



**ITS:** Desnaturalización a 95 °C por 1 min, durante 32 ciclos el siguiente programa; desnaturalización a 95 °C por 20 s, 1 min de alineamiento a 52 °C y una extensión por 1 minutos a 72 °C, 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 3 min.

**18S (SSU):** Desnaturalización a 95 °C por 1 min, durante 35 ciclos el siguiente programa; desnaturalización a 95 °C por 15 s, 30 s de alineamiento a 52 °C y una extensión por 1:30 minutos a 72 °C, 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 3 min.

**28S (LSU):** Desnaturalización a 95 °C por 1 min, durante 35 ciclos el siguiente programa; desnaturalización a 95 °C por 15 s, 30 s de alineamiento a 48 °C y una extensión por 3 minutos a 72 °C, 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min.

**PR1A:** La amplificación del fragmento del gen de la proteasa PR1A consiste en una PCR anidada: La primera reacción de PCR se realizó con los oligonucleótidos METPR1 y METPR4 usando DNA cromosómico y la segunda PCR se realizó con los oligonucleótidos METPR2 y METPR5 usando el producto de la primera reacción de PCR. Para ambas reacciones de PCR se utilizaron las siguientes condiciones: Desnaturalización a 95 °C por 4 min, durante 37 ciclos el siguiente programa; desnaturalización a 95 °C por 1 min, 1:15 min de alineamiento a 58 °C y una extensión por 2 minutos a 72 °C, 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 6 min.

#### Purificación de los productos de PCR

La purificación de los diferentes fragmentos de PCR se llevaron a cabo empleando el kit de extracción GenElute™ Gel Extraction de la marca Sigma de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

#### Clonación en el vector pGEM®-T Easy

Para la ligación de los fragmentos al vector pGEM®-T Easy se realizó la siguiente mezcla de reacción: de 1 a 3 µL, dependiendo de la concentración de cada muestra individual del producto de PCR purificado, 5 µL del buffer 2X Rapid Ligation (60mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM DTT, 2mM ATP, 10 % polietilén glicol), 0,25 µL del vector pGEM®-T Easy, 1 µL de T4 DNA Ligase, se completó el volumen con agua grado HPLC hasta 10 µL. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante toda la noche.

#### Transformación de *E. coli* DH5α por choque térmico

La transformación de *E. coli* DH5α se llevó de la siguiente manera: En un tubo Eppendorf estéril se añadieron 25 µL de células químicamente competentes de *E. coli* y 2 µL de DNA,



mezclando suavemente e incubando posteriormente por 20 min en hielo. Después, se incubó por 2 min a 42 °C, seguido de una incubación en hielo por 2 minutos. Se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó por 1 h a 37°C. En seguida se centrifugó por 1 min a 20,800  $xg$ , se descartaron 800  $\mu L$  del sobrenadante y la pastilla se resuspendió en los 200  $\mu L$  restantes y se sembraron 100  $\mu L$  por espatulado con asa de vidrio en una caja de Petri con medio LB-Amp + IPTG. Se incubó toda la noche a 37°C (Sambrook y Russel, 2001).

#### Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Para la extracción de DNA plasmídico de las células de *E. coli* se preparan tubos de ensayo con 8 mL de medio de cultivo LB-ampicilina. Con un palillo estéril se tomaron aquellas colonias de color blanco, se inoculó una línea pequeña en una caja con medio LB-Amp sólido y el resto se inoculó en un tubo con medio líquido. Los tubos fueron puestos en agitación y se incubaron a 37 °C durante toda la noche, al igual que la caja con medio sólido. Después del tiempo de incubación, cada cultivo fue colocado en un tubo Eppendorf de 2 mL y se centrifugó por 1 min a 20800  $xg$  en una centrifuga Eppendorf 5417C, desechando el sobrenadante y repitiendo el procedimiento hasta que se recuperó por completo todas las células del cultivo. La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el kit GenElute™HP Plasmid Miniprep de la marca Sigma de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

#### Tratamiento con endonucleasas de restricción

Para realizar la comprobación de que el fragmento de interés se encuentre en el vector pGEM®-T Easy se realizó un corte con la enzima de restricción *EcoRI* de la marca New England Biolabs, se siguieron las siguientes condiciones recomendadas por el fabricante: La mezcla de reacción contenía 2  $\mu L$  de cada muestra individual, 0,5  $\mu L$  de la enzima de restricción *EcoRI*, 1,5  $\mu L$  del Buffer CutSmart® (acetato de potasio 50 mM , tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, 100  $\mu g/ml$  BSA y pH 7,9 a 25°C) y 11  $\mu L$  de agua grado HPLC, para completar a un volumen de 15  $\mu L$ . La mezcla de reacción se dejó en incubación a 37°C por 3 h.

#### Separación de DNA mediante electroforesis

Cuando se requirió el análisis de la integridad, la concentración, la purificación de DNA o en la comprobación del fragmento mediante enzimas de restricción, el DNA se sometió a una separación mediante electroforesis en gel de agarosa (Sambrook y Russell, 2001). La agarosa se preparó al 1,5% (p/v) en regulador TAE 1X (Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 5 mM pH8) y se adicionaron 4  $\mu L$  de SYBR® Safe DNA gel STAIN (10000X;



Invitrogen) por cada 100 mL de agarosa. La separación de los fragmentos se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 80 V (Purificación de los productos de PCR, voltaje=60) en una cámara de electroforesis con el mismo regulador TAE 1X. El DNA se visualizó en un transiluminador Safe Image (Invitrogen). El tamaño de las bandas se determinó por comparación con marcadores de tamaño de DNA.

### Secuenciación

La secuenciación de los plásmidos se llevó a cabo por la compañía Elim Biopharmaceuticals, Inc, USA.

### Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó usando el software Lasergen® 14 de DNASTAR; usando los programas Seq Man, Edit Seq y Meg Aling. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante el algoritmo MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/> (Kepler *et al.*, 2014) y la generación de los árboles filogenéticos se obtuvo mediante el programa MEGA7.0.26 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Los árboles filogenéticos se obtuvieron por los métodos estadísticos de máxima verosimilitud y máxima parsimonia, utilizando el modelo GTR (General Time Reversible). Para la creación del árbol de inferencia Bayesiana se utilizó el programa Mr Bayes v3.2.6 utilizando el modelo GTR con rango de distribución gamma invariable. Todos los árboles filogenéticos se realizaron con la prueba filogenética del método Bootstrap=1000.



## RESULTADOS

El propósito del presente trabajo fue la obtención de nuevos aislados pertenecientes al género *Metarhizium* del estado de Guanajuato. Tener una amplia colección del género *Metarhizium* nos permite aprovechar la biodiversidad del estado de Guanajuato al encontrar aquel o aquellos aislados que tengan un mayor potencial para promover el crecimiento vegetal en especies de interés agrícola.

### Estandarización del medio de aislamiento para *Metarhizium*

En la literatura se presentan varios medios cultivo para el aislamiento de hongos entomopatógenos (Beilharz *et al.*, 1982; Tae-Young *et al.*, 2010) los cuales consisten en el uso de antibióticos y fungicidas para evitar el crecimiento de hongos de crecimiento rápido y así permitir el crecimiento de hongos que crecen más lento, tal es el caso de *Metarhizium*.

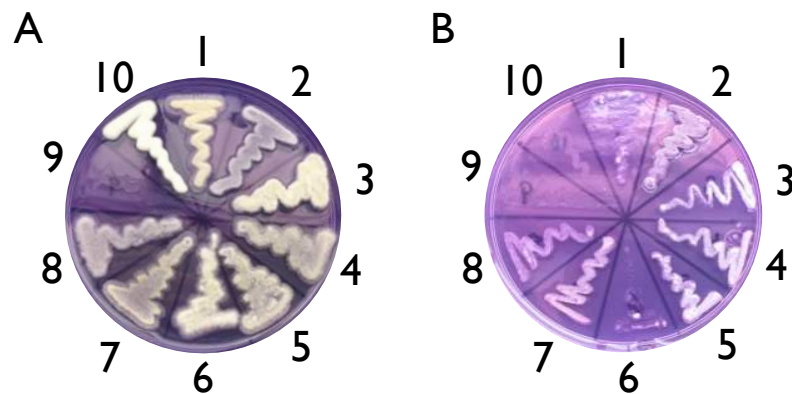
Primero se estandarizaron las concentraciones de los fungicidas que se usaron; ya sea dodina o tiabendazol, ya que existen diferencias entre los reactivos utilizados y las muestras de tierra utilizados en trabajos previos (Beilharz *et al.*, 1982; Fernandes *et al.*, 2010). Los medios usados en estos trabajos incluyen un medio rico, compuesto por papa dextrosa agar 40 g/L, extracto de levadura 1 g/L, el antibiótico cloranfenicol 0,5 g/L, cicloheximida 0,25 g/L, cristal violeta 0,01 g/L y el fungicida dodina o tiabendazol. Se partió de las concentraciones usadas por Beilharz en 1982 y Fernandes en el 2010 variando solo las concentraciones de los fungicidas dodina (0,01, 0,02, 0,05, 0,075 y 0,1 g/L) y tiabendazol (0,001, 0,002, 0,004, 0,006 y 0,01 g/L). En los medios de aislamiento se realizaron ensayos de crecimiento con las cepas del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos (Tabla 4), se sembró un estriado de una solución de  $1 \times 10^7$  conidios/mL en los diferentes medios de selección.

**Tabla 4. Cepas usadas para la estandarización del medio de aislamiento**

No.	Cepa	Género y Especie
1	CARO4	<i>M. robertsii</i>
2	CARO7	<i>M. brunneum</i>
3	CARO11	<i>M. brunneum</i>
4	CARO12	<i>M. brunneum</i>
5	CARO19	<i>M. brunneum</i>
6	ARSEF23	<i>M. robertsii</i>
7	E6	<i>M. anisopliae</i>
8	ARSEF2575	<i>M. robertsii</i>
9	ARSEF7486	<i>M. acridum</i>
10	ARSEF252	<i>B. bassiana</i>



En ambos fungicidas no se observa crecimiento de la cepa ARSEF7486 perteneciente a *M. acridum* (Figura 8), por lo cual se realizaron medios de cultivo con los componentes por separado, manteniendo solo las concentraciones de PDA y extracto de levadura, teniendo así los siguientes medios; medio con dodina (0,1 g/L), medio con tiabendazol (0,01 g/L), medio con cloranfenicol (0,5 g/L), medio con cicloheximida (0,25 g/L) y medio con cristal violeta (0,01 g/L) de esta manera se determinó a cual componente es susceptible la cepa ARSEF7486 de *M. acridum*.



**Figura 8. Estandarización del medio de aislamiento para *Metarhizium*.** A) Medio de selección con el fungicida dodina (0,1 g/L). B) Medio de selección con el fungicida tiabendazol (0.01 g/L). 1.- CARO4 (*M. robertsii*), 2.- CARO7 (*M. brunneum*), 3.- CARO11 (*M. brunneum*), 4.- CARO12 (*M. brunneum*), 5.- CARO19 (*M. brunneum*), 6.- ARSEF23 (*M. robertsii*), 7.- E6 (*M. anisopliae*), 8.- ARSEF2575 (*M. robertsii*), 9.- ARSEF7486 (*M. acridum*) y 10.- ARSEF252 (*B. bassiana*).

No se observó crecimiento de la cepa ARSEF7486 en el medio que contenía solo cristal violeta. Para que aislados de la especie *M. acridum* a la cual pertenece la cepa ARSEF7486 pudiera crecer en estos medios se disminuyó la concentración de cristal violeta a 0,0025 g/L. Ya que las pruebas realizadas para la estandarización del medio de selección fueron hechas con las cepas del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos (Tabla 4), era necesario probar los medios de selección con muestras de tierra proveniente de las áreas naturales protegidas, ya que en la rizósfera existe una gran población de microorganismos contaminantes que influyen en el aislamiento de *Metarhizium*.

Se realizaron tres medios de selección en los cuales se mantuvo constante la concentración de PDA, extracto de levadura, cloranfenicol y cicloheximida, mientras que los fungicidas y el cristal violeta se variaron de la siguiente manera: **A)** Medio con dodina (0,01 g/L) y cristal violeta (0,0025 g/L.), **B)** Medio con dodina (0,01 g/L) sin cristal violeta, **C)** Medio con



tiabendazol (0,010 g/L) sin cristal violeta. Las pruebas se realizaron con tierra proveniente de zona de Las Palomas perteneciente al área natural protegida de Cuenca de la Esperanza. Lo observado en los medios de aislamiento con muestras de suelo era lo siguiente: En todos los medios de selección se observa crecimiento de microorganismos, en el medio **C** es el que presenta mayor cantidad de crecimiento.

Dado los resultados observados con el medio de selección **C**, a esta concentración de tiabendazol (0,010 g/L) no se observó el crecimiento esperado de las cepas pertenecientes al Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, además se observó un mayor número de microorganismos contaminantes en las muestras de tierra perteneciente a Las Palomas. Por este motivo se descartó el medio con el fungicida tiabendazol ya que todas las cepas muestran un crecimiento pobre. Mientras con los medios **A** y **B** se decidió utilizar concentraciones mayores del fungicida dodina. Se usaron concentraciones del fungicida dodina variando desde 0,1 g/L hasta 0,5 g/L aumentando cada 0,1 g/L. Al igual que en los experimentos pasados se usaron los aislados provenientes del Laboratorio de Genética Molecular de hongos.

Se observó crecimiento de las cepas en las concentraciones de 0,1 g/L, 0,2 g/L y 0,3 g/L del fungicida, sin embargo se ve disminuido el crecimiento de las cepa CARO7 a partir de la concentración de 0,2 g/L, además en la concentración de 0,3 g/L del fungicida se observa poco crecimiento de la cepa ARSEF2575, en la concentración de 0,4 g/L no se observa el crecimiento de tres cepas; CARO7, ARSEF2575 y ARSEF7486. Y en el medio de selección con 0,5 g/L de dodina no se observó crecimiento de ninguna cepa.

Por los resultados obtenidos variando las concentraciones del fungicida dodina se seleccionó una concentración intermedia entre 0,1 g/L y 0,2 g/L. El medio de selección para *Metarhizium* quedó de la siguiente manera: 40 g del medio rico papa dextrosa agar, 1 g de extracto de levadura, 0,5 g de cloranfenicol, 0,25 g de cicloheximida y 0,15 g del fungicida dodina. Se realizó otro medio de selección para *Metarhizium* adicionando al medio anterior 0,0025 g/L de cristal violeta.





### Obtención de los aislados de *Metarhizium*

La obtención de los aislados de este trabajo fue a partir de muestras de tierra tomadas de la rizósfera de plantas sanas de las áreas naturales protegidas del norte del estado de Guanajuato (Tabla 5).

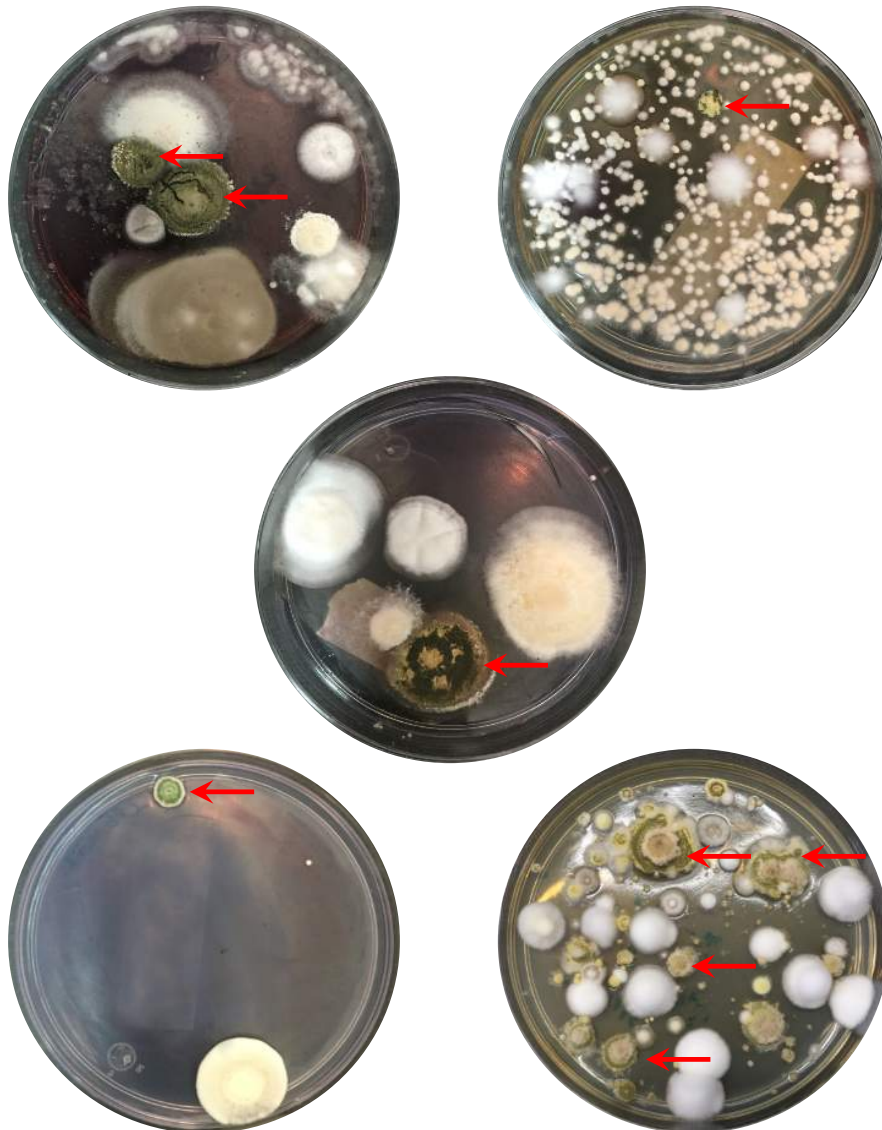
Tabla 5. Áreas naturales protegidas donde se realizó el muestreo

Área natural protegida	Código	Coordenadas (GMS)	Altitud (msnm)	Descripción del área
Las Palomas	PCP	21°3'52.2" N 101°13'31.22" O	2506	Bosque de encino predominante, clima templado-subhúmedo
Sierra de Guanajuato, municipio de Santa Rosa	SR	21°4'47.6" N 101°11'1.69" O	2560	Bosque de encino predominante, clima templado-subhúmedo
Cuenca de la Esperanza	LCP	21°3'55.17" N 101°13'39.66" O	2424	Bosque de encino, zonas con bosque en galería y selvas bajas caducifolias, clima templado-subhúmedo
Cerro del Cubilete	CU, EC, ECLC	20°59'20" N 101°22'19" O	2320- 2011	Bosque de encino predominante clima templado-subhúmedo
Santa Catarina	STC	21°11'20" N 99°49'2" O	2160	Matorral alto predominante, Bosque pino-encino clima semiseco-semicálido
Atarjea	AT	21°16'05" N 99°13'00" O	2043- 1221	Bosque de pino-encino, selvas bajas, clima semicálido-subhúmedo, cálido-subhúmedo.

Posterior a la toma de muestra (como se describe anteriormente en materiales y métodos) se inocularon 100 µL de cada muestra en los medios de selección para *Metarhizium*. Se observó el crecimiento en los medios de selección y se tomaron aquellas colonias con las características típicas de *Metarhizium* (conidios cilíndricos ovalados y color de colonia verde con consistencia terrosa).



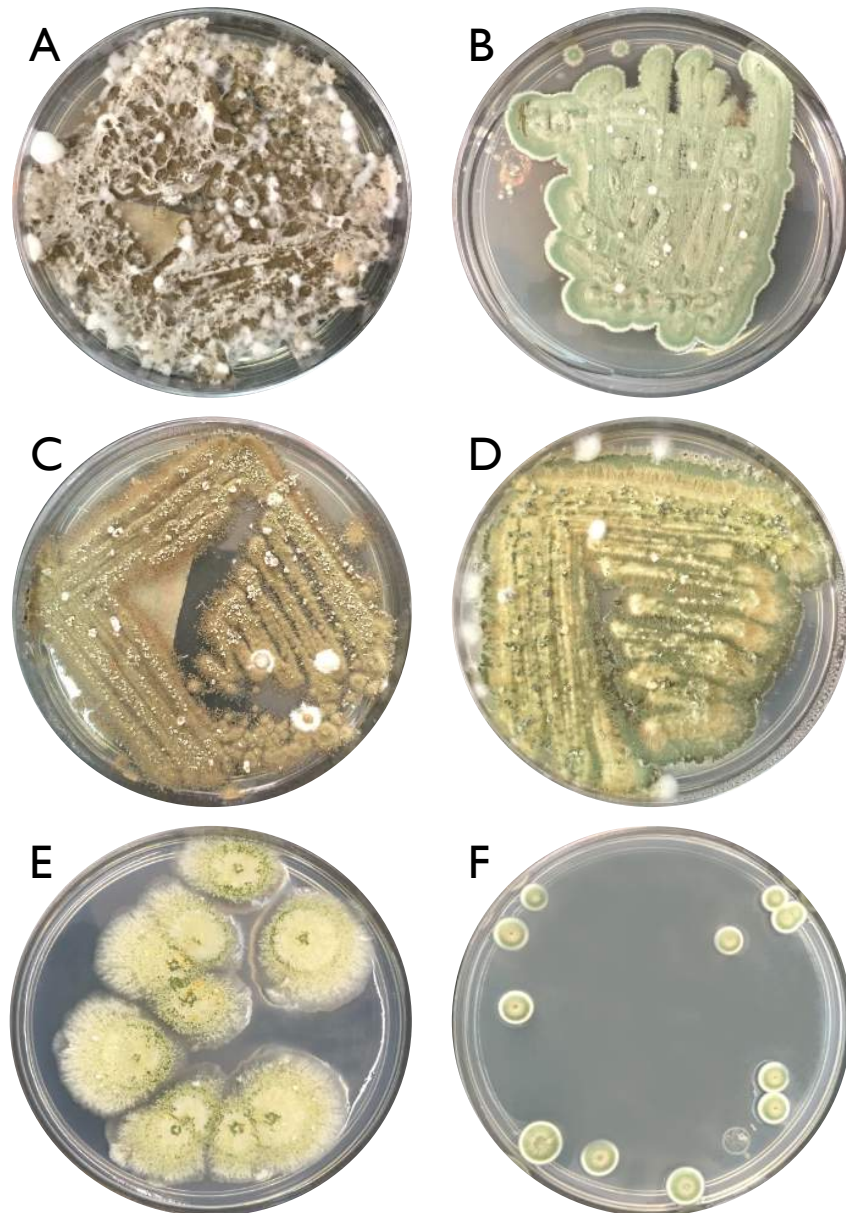
Las muestras obtenidas fueron nombradas con el código asignado del área que se realizó el muestreo (Tabla 5), seguido del número de muestra donde se encontró el aislado de *Metarhizium*. Después de 20 días de inoculación en los medios de aislamiento se observa el crecimiento de colonias de *Metarhizium* (Figura 9).



**Figura 9. Obtención de los aislados de *Metarhizium*.** Las flechas rojas indican las colonias del hongo *Metarhizium*, las cuales se pasaron a un medio de selección fresco de resiembra.



Posteriormente los aislados se pasaron en medio fresco de resiembra, los cuales se incubaron hasta observar su conidiación (Figura 10), se colectaron los conidios de los aislados y se realizaron diluciones para obtener monoclonias, de esta manera se identificó si en el aislado se tienen más de una morfología colonial o aún existen contaminantes de otros hongos y de esta manera tener un cultivo axénico de los aislados.



**Figura 10. Aislados del hongo *Metarhizium*.** Aislados en medio fresco de resiembra, **A)** Aislado LCP13, **B)** Aislado LCP16, **C)** Aislado PCP42-3, **D)** Aislado SR19. Obtención de monoclonias de los aislados **E)** SR19 y **F)** LCP16.



Estos procedimientos se realizaron para todos los aislados, hasta obtener cada aislado libre de hongos y bacterias contaminantes. Se muestran el total de muestras tomadas, muestras positivas a la presencia de *Metarhizium*, porcentaje de muestras positivas y aislados obtenidos de cada zona donde se muestreo (Tabla 6).

**Tabla 6. Muestras totales, muestras positivas y aislados obtenidos**

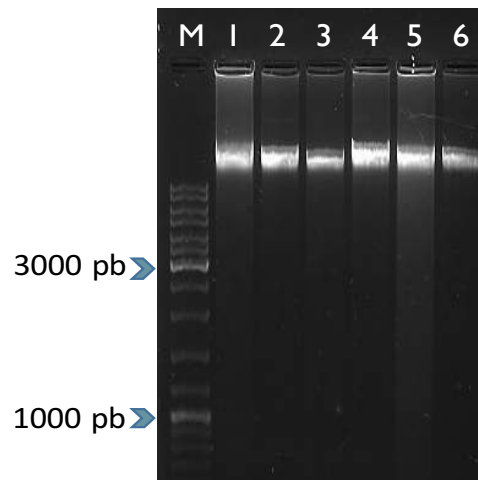
Área natural protegida	Muestras tomadas	Muestras positivas	% Muestras positivas	Aislados*
Las Palomas	43	6	13,95	17
Cuenca de la Esperanza	29	5	17,24	8
Sierra de Guanajuato municipio de Santa Rosa	27	4	14,81	5
Cerro del Cubilete	66	11	16,66	16
Sta. Catarina	15	2	13,33	2
Atarjea	26	7	26,92	11
Total	206	35	16,99	59

\*Los aislados corresponden a colonias con morfología típica de *Metarhizium*.

Cabe resaltar que en todas las zonas en que se muestrearon se encontraron aislados de *Metarhizium*. En Las Palomas se encontraron 17 aislados en un total de 6 muestras positivas de las 43 muestras tomadas que corresponde a un 13,95 %, en Atarjea se encontraron 11 aislados en un total de 7 muestras positivas de las 26 muestras que corresponde a un 16,99 %.

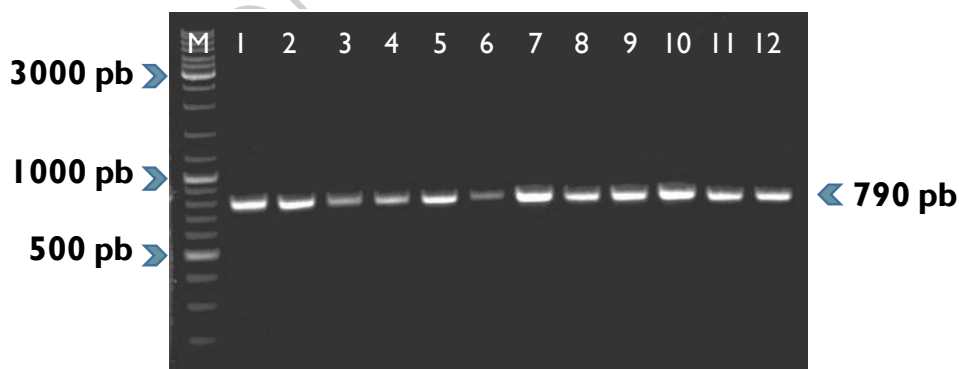
### Caracterización molecular de los aislados de *Metarhizium*

Teniendo cultivos axénicos de los 59 aislados se prosiguió con la caracterización molecular para corroborar que los aislados obtenidos pertenecen al género *Metarhizium* e identificar su especie, para ello se extrajo de DNA de todos los aislados. Posteriormente se observó la calidad del DNA genómico de los aislados mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 11).

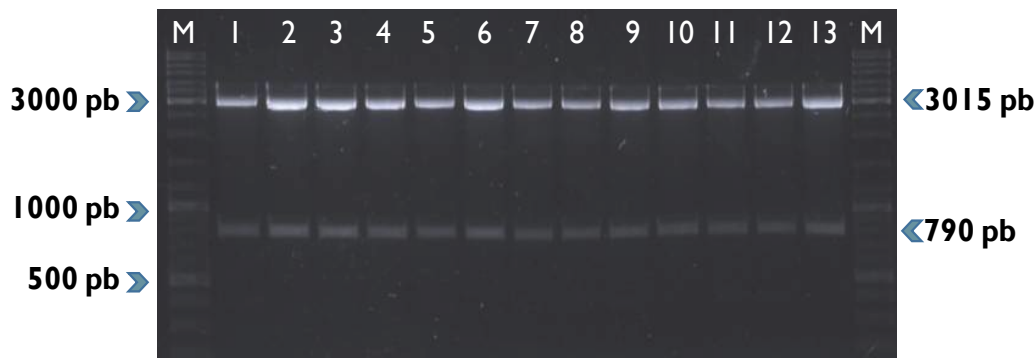


**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico.** Figura representativa del DNA genómico de algunos de los aislados obtenidos. Carril; 1) PCP1, 2) PCP2, 3) PCP10-5, 4) LCP5, 5) LCP13, 6) LCP16. M) Marcador de tamaño molecular

Con el DNA genómico de los aislados se realizó la amplificación de un fragmento del factor de elongación  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ), esperando un tamaño del amplicón de aproximadamente 790 pb (Figura 12). Posteriormente los amplicones se purificaron y se clonaron en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Con el producto de la ligación se transformó en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, para la extracción de DNA plasmídico y se comprobó la inserción del fragmento EF- $1\alpha$  mediante restricción con la enzima *EcoRI* (Figura 13).



**Figura 12. Amplificación del fragmento del factor de elongación  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ).** Figura representativa de la amplificación del EF- $1\alpha$  de algunos de los aislados obtenidos, con un tamaño aproximado de 790 pb. Carril; 1) PCP1, 2) PCP2, 3) PCP10-5, 4) LCP5, 5) LCP13, 6) LCP16, 7) SR7, 8) SR19, 9) SR9CV, 10) 11) CU2-4, 12) EC13-1, M) Marcador de tamaño molecular.



**Figura 13. Comprobación de la inserción de un fragmento del gen EF-1 $\alpha$  en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy.** Figura representativa de la inserción de un fragmento del gen EF-1  $\alpha$  de algunos de los aislados obtenidos. Carril; 1) PCP7-2, 2) PCP10-1.5, 3) LCP29-1.1, 4) LCP29-1.2, 5) LCP29-2, 6) CU3, 7) CU11CV, 8) EC25, 9) EC26 , 10) AT1-1, 11) AT3, 12) ATC4, 13) STC8, M) Marcador de tamaño molecular.

Esta comprobación nos indica que los plásmidos purificados cuentan con el fragmento de interés del EF-1 $\alpha$ , de los cuales posteriormente se secuenciaron ambas cadenas de DNA, mediante los oligonucleótidos universales T7 y SP6 que de hibridan en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

Las secuencias se analizaron mediante el paquete informático Lasergen<sup>®</sup> 14 de DNASTAR y los programas MEGA7 y Mr Bayes. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias reportadas de *Metarhizium* por Bischoff *et al.* en el 2009, de esta manera se identificó la especie a la que pertenecían los aislados de *Metarhizium* obtenidos en este trabajo. El árbol filogenético que se muestra (Figura 14), fue el que se obtuvo realizando el método estadístico de máxima verosimilitud, con los valores de cada bootstrap mostrados de la siguiente manera; máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia Bayesiana, cada especie mostrada en los árboles filogenéticos son representadas por un color en particular. Las secuencias de referencia muestran el número de acceso de la base de "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) y el código de identificación de "Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures" (ARSEF).

Además de generar el árbol filogenético se comparó el porcentaje de identidad de los aislados pertenecientes a cada clado filogenético por especie mediante alineamiento tipo clustal W comparando tanto los aislados de este trabajo y las cepas reportadas por Bischoff *et al.* en el 2009 (Figura 15, Tabla 7).



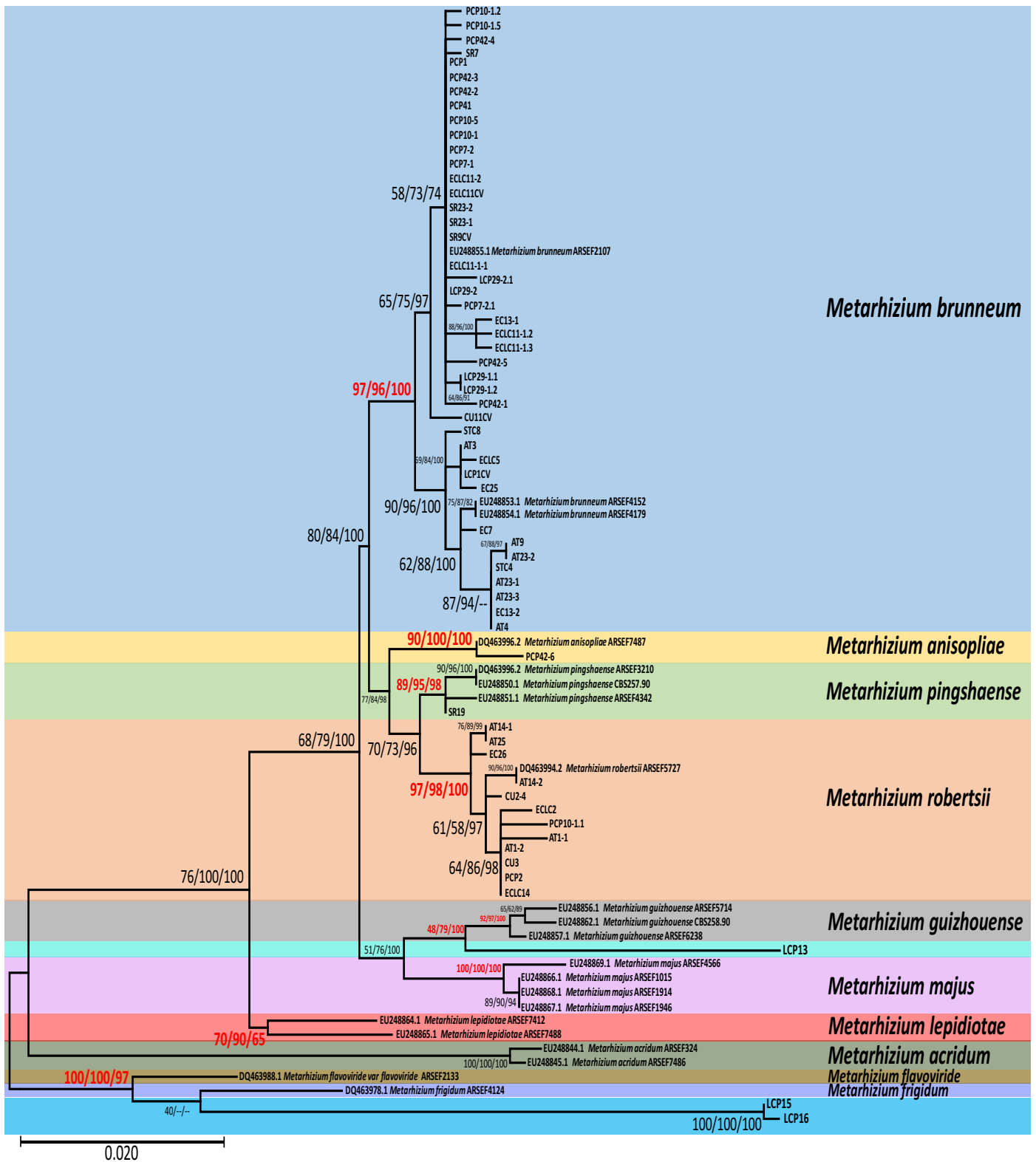


Figura 14. Árbol filogenético de los aislados obtenidos en el trabajo. Se incluyeron las cepas reportadas por Bischoff *et al.* en el 2009. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de bootstrap en el orden siguiente máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana, en rojo se representa los valores que indican la separación de las especies.





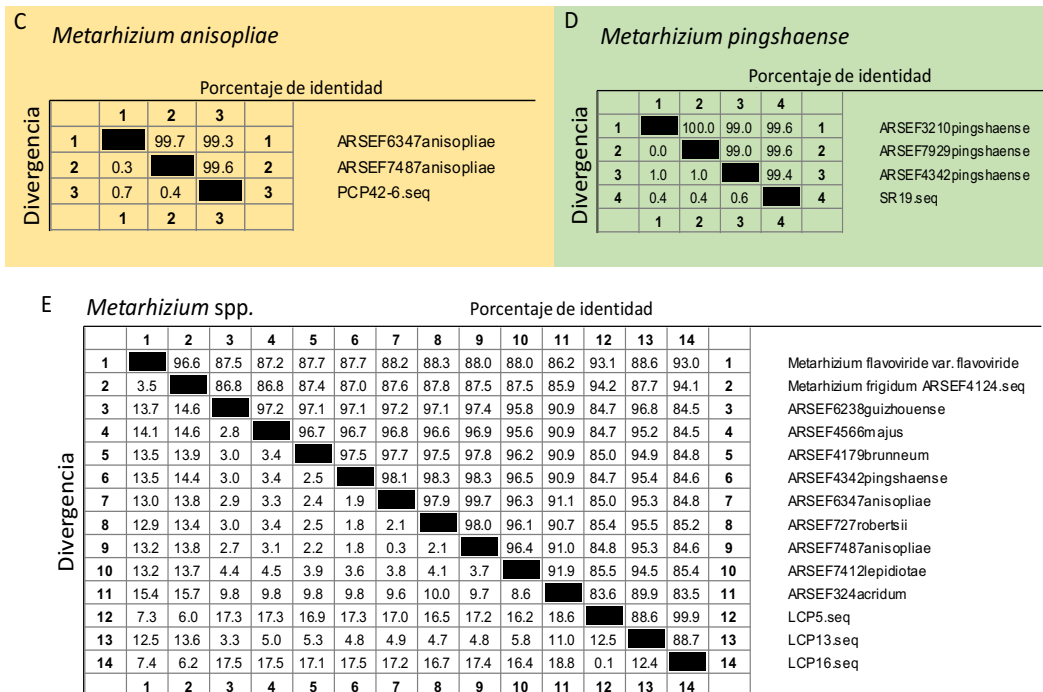


Figura 15. Porcentaje de identidad entre los aislados de *Metarhizium* (continuación). A) *Metarhizium brunneum* B) *Metarhizium robertsii* C) *Metarhizium anisopliae* D) *Metarhizium pingshaense* E) *Metarhizium spp.* Los aislados se compararon con las especies reportadas por Bischoff *et al.* en el 2009.

Tabla 7. Porcentaje de identidad de los aislados y cepas de referencia de *Metarhizium*

Género y especie	Total de aislados obtenidos	Rango de porcentaje de identidad de los aislados	Número de bases distintas
<i>Metarhizium brunneum</i>	42	97,8 - 99,9	1 - 18
<i>Metarhizium robertsii</i>	12	99,0 - 99,9	1 - 8
<i>Metarhizium pingshaense</i>	1	99,0 - 99,6	3 - 8
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1	99,3 - 99,7	2 - 6
<i>Metarhizium spp.</i>	3	---	---



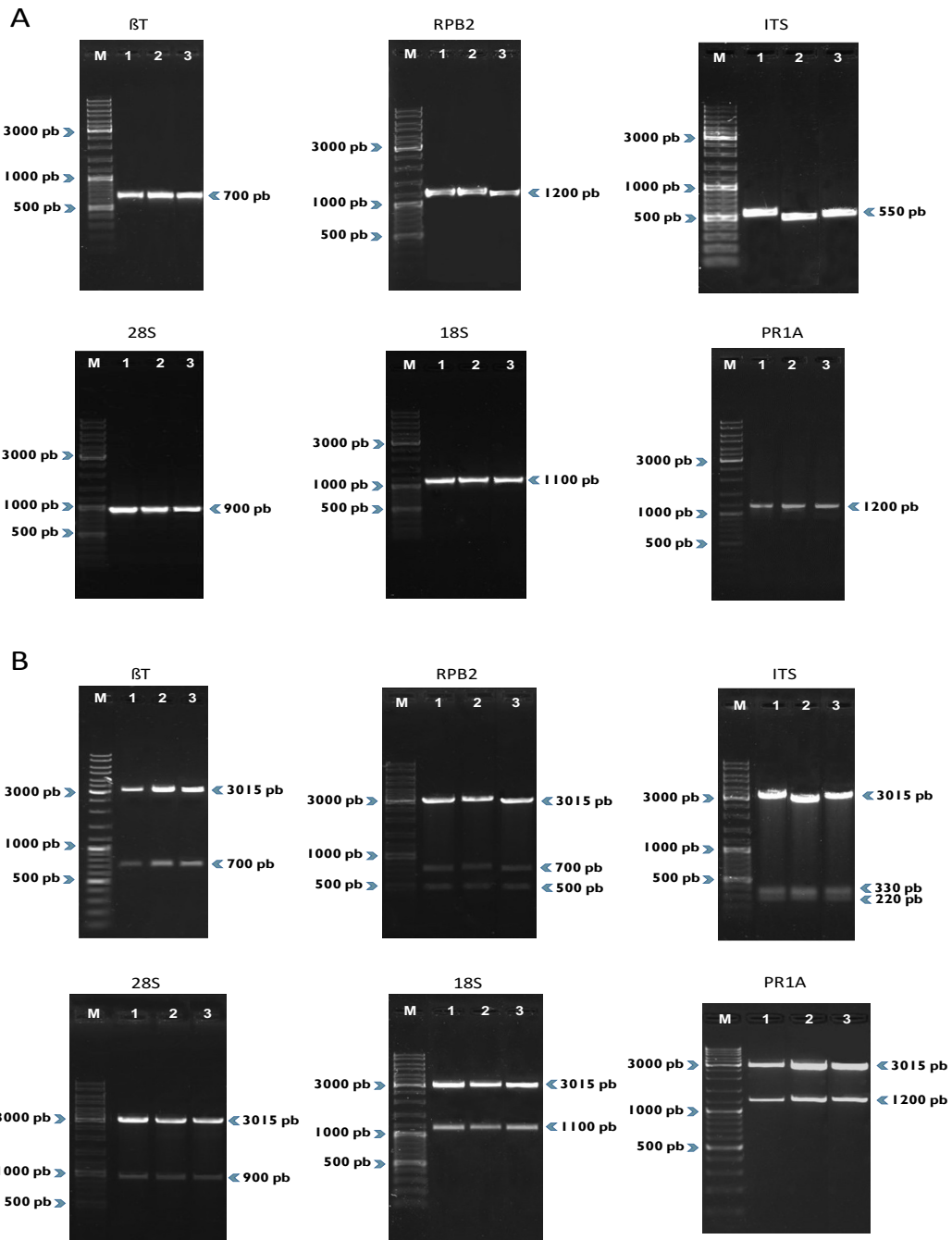
### Identificación de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16

De los aislados identificados, tres de ellos no se pudieron clasificar: LCP5, LCP13 y LCP16. El análisis de la secuencia de los aislados muestra que entre los aislados LCP5 y LCP16 existe un 99,9 % de identidad, teniendo solo una base de diferencia. Entre estos aislados y el aislado LCP13 existe un 88,6 % y 88,7 % de identidad respectivamente.

En los análisis se observa que los aislados LCP5 y LCP16 tienen un porcentaje de identidad de 94,2 % y 94,2 % respectivamente con la cepa ARSEF4124 de *M. frigidum*, mientras que con la cepa ARSEF2133 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* muestran un 93,1 % y 93 % de identidad. El aislado LCP13 tienen un porcentaje de identidad de 96,8 % con la cepa ARSEF6238 de *M. guizhouense*, mientras que con la cepa ARSEF4566 de *M. majus* muestra un 95,2 % de identidad (Figura 15-E).

Los aislados LCP5 y LCP16 tienen un mayor porcentaje de identidad con *M. frigidum* que con las demás especies, mientras que el aislado LCP13 tienen un mayor porcentaje de identidad con *M. guizhouense*; sin embargo, estos porcentajes de identidad no son suficientes para clasificarlos dentro de un clado reportado, ya que los porcentajes de cepas utilizadas en el trabajo de Bischoff *et al.* en el 2009 y los aislados utilizados en este trabajo que si se clasificaron dentro de un clado reportado van desde un 97,8 % hasta un 99 % de identidad (Figura 15). Bischoff *et al.* en el 2009, realizaron el análisis de los genes RPB2,  $\beta$ T e incluyendo el factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ), con este análisis se generaron un árbol multigénico, concluyendo que con solo el EF-1 $\alpha$  se puede dar la resolución de las especies de *Metarhizium*. Al no poder identificar los aislados LCP5, LCP13 y LCP16 con la secuencia del gen EF-1 $\alpha$  es muy probable que se trate de dos nuevas especies. Para determinar si se trata de nuevas especies de *Metarhizium* o si se pueden clasificar dentro de algún clado ya reportado, se realizó el análisis de la secuencia de los fragmentos de los genes  $\beta$ T, RPB2, 28S, 18S, PR1A y región ITS. El fragmento del gen de la proteasa PR1A fue usado por Leal *et al.* en 1997 para la caracterización de cepas de *Metarhizium*. Mientras que los genes de la región ITS y los fragmentos de los genes 28S y 18S fueron utilizados por Montalva *et al.* en el 2016 y Luangsa-ard *et al.* en el 2017 para la identificación de nuevas especies de *Metarhizium*.

Se realizó la amplificación de los fragmentos de los genes  $\beta$ T, RPB2, 28S, 18S, PR1A y región ITS (Figura 16-A) con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 3. Los amplicones se purificaron y se clonaron en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Con el producto de la ligación se transformó en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, para la extracción de DNA plasmídico y se comprobó la inserción de los fragmentos mediante restricción con la enzima *EcoRI* (Figura 16-B).



**Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de los genes  $\beta T$ , RPB2, 28S, 18S, PR1A y región ITS. A) Amplificación de los genes  $\beta T$ , RPB2, ITS, 28S, 18S y PR1A. Carril 1) LCP5, 2) LCP13, 3) LCP16, M) Marcador de tamaño molecular. B) Comprobación de la inserción de los genes  $\beta T$ , RPB2, ITS, 28S, 18S y PR1A en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Carril 1) LCP5, 2) LCP13, 3) LCP16, M) Marcador de tamaño molecular.**



Al igual que las las secuencias del EF-1 $\alpha$ , las secuencias de los distintos genes se analizaron, mediante el paquete informático Lasergen® 14 de DNASTAR y los programas MEGA7 y Mr Bayes. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias reportadas de *Metarhizium* por Bischoff *et al.* en el 2009, para el caso de los fragmentos de los genes de  $\beta$ T, RPB2 y región ITS. Se realizaron árboles filogenéticos de cada gen individual,  $\beta$ T (Figura 17), RPB2 (Figura 18) y región ITS (Figura 19) y un árbol multigénico conteniendo la información de estos genes y además incluyendo la secuencia del factor de elongación 1 $\alpha$  (Figura 20). Mientras que los fragmentos de los genes 28S (Figura 21) y 18S (Figura 22) fueron comparados con las secuencias reportadas por Luangsa-ard *et al.* en el 2017, de los cuales solo se generó el árbol de cada gen individual. El fragmento del gen de la proteasa PR1A (Figura 23) fue comparado con secuencias reportadas por Leal *et al.* en 1997 y secuencias obtenidas de la base de datos de “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI).

CONFIDENCIAL

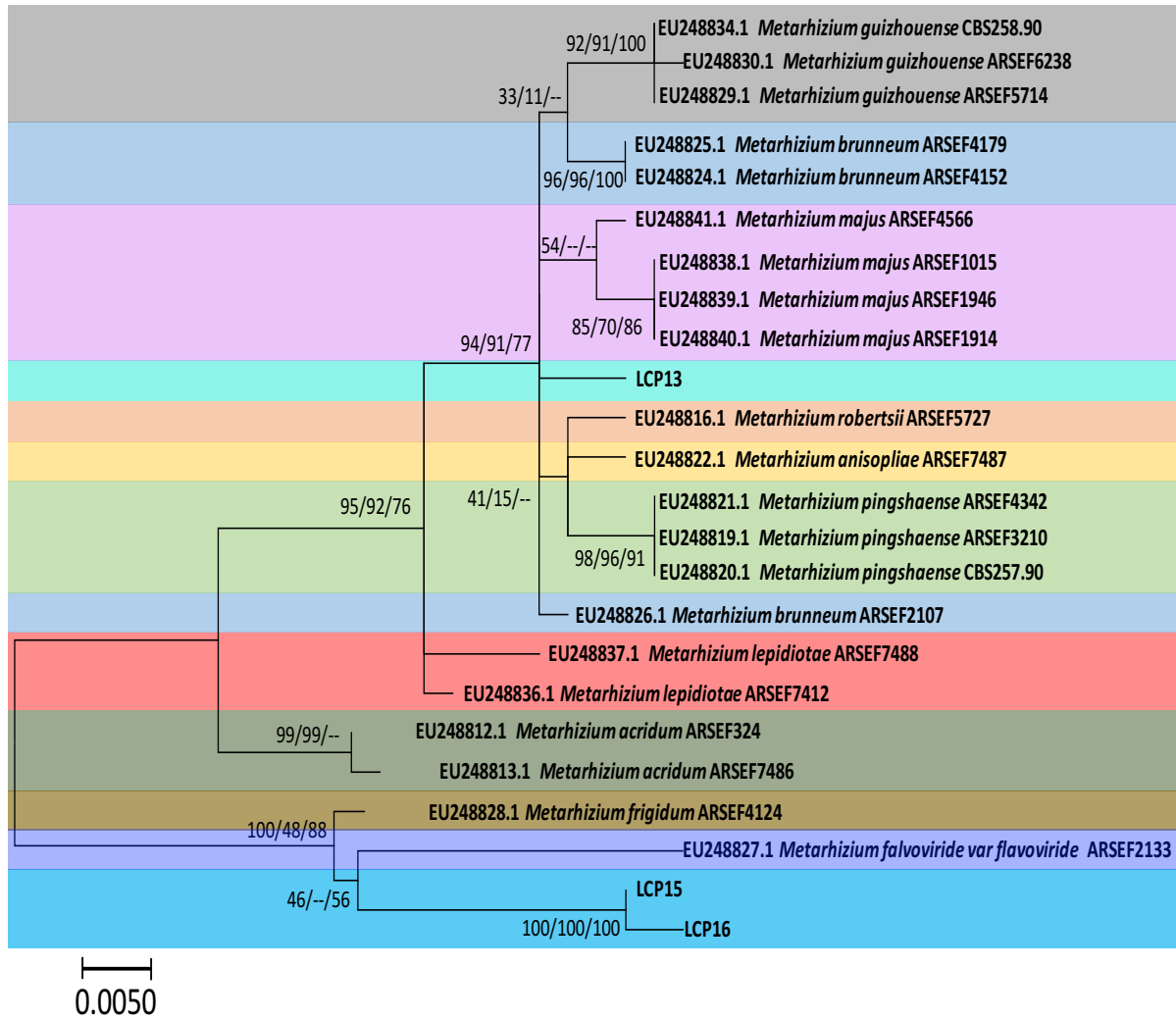


Figura 17. Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen Beta Tubulina (BT) de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de bootstrap en el orden siguiente máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana.

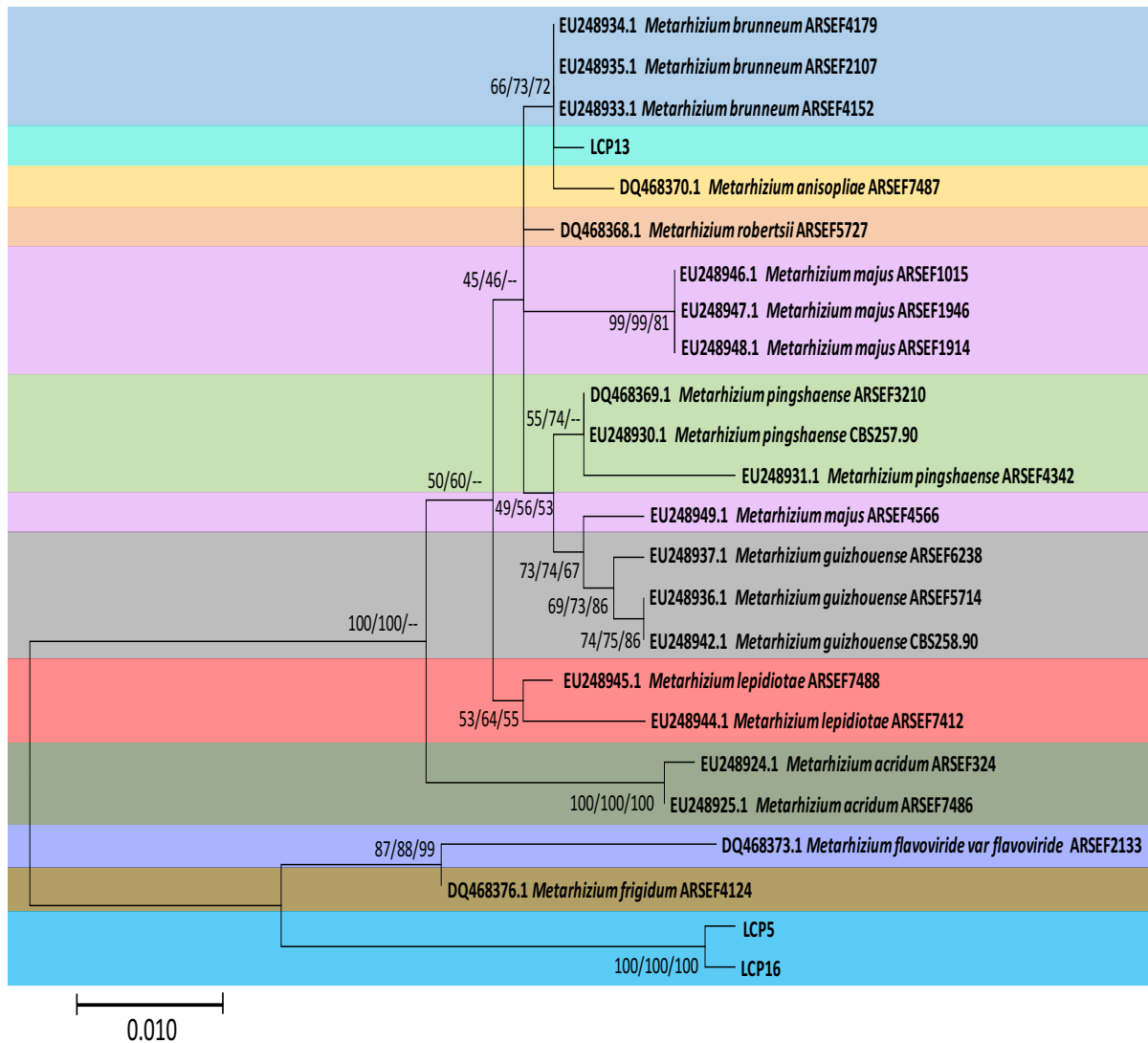


Figura 18. Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen de la segunda subunidad de la RNA polimerasa II (RPB2) de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de bootstrap en el orden siguiente máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana.

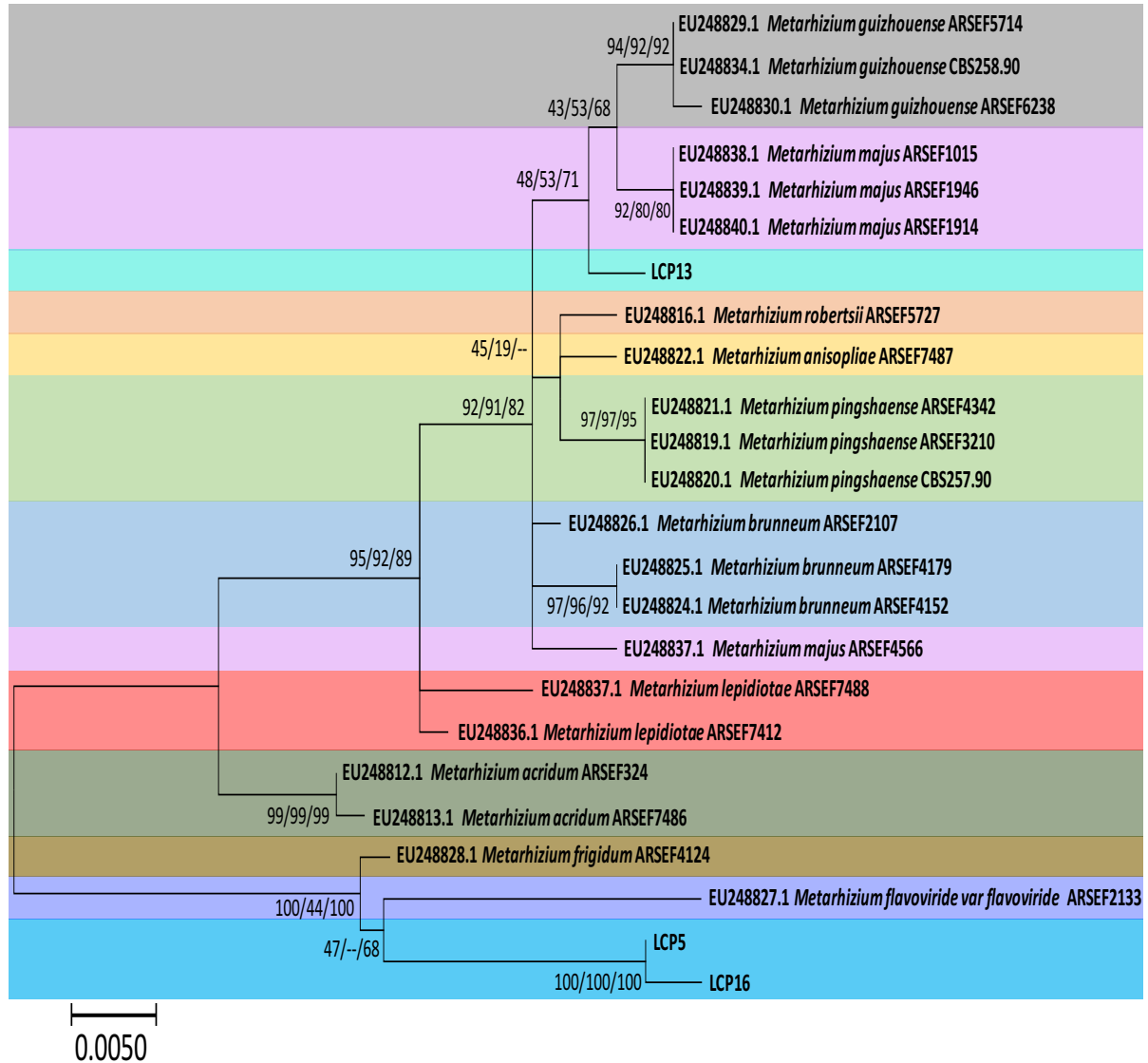


Figura 19. Árbol filogenético de la región ITS de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de bootstrap en el orden siguiente máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana.

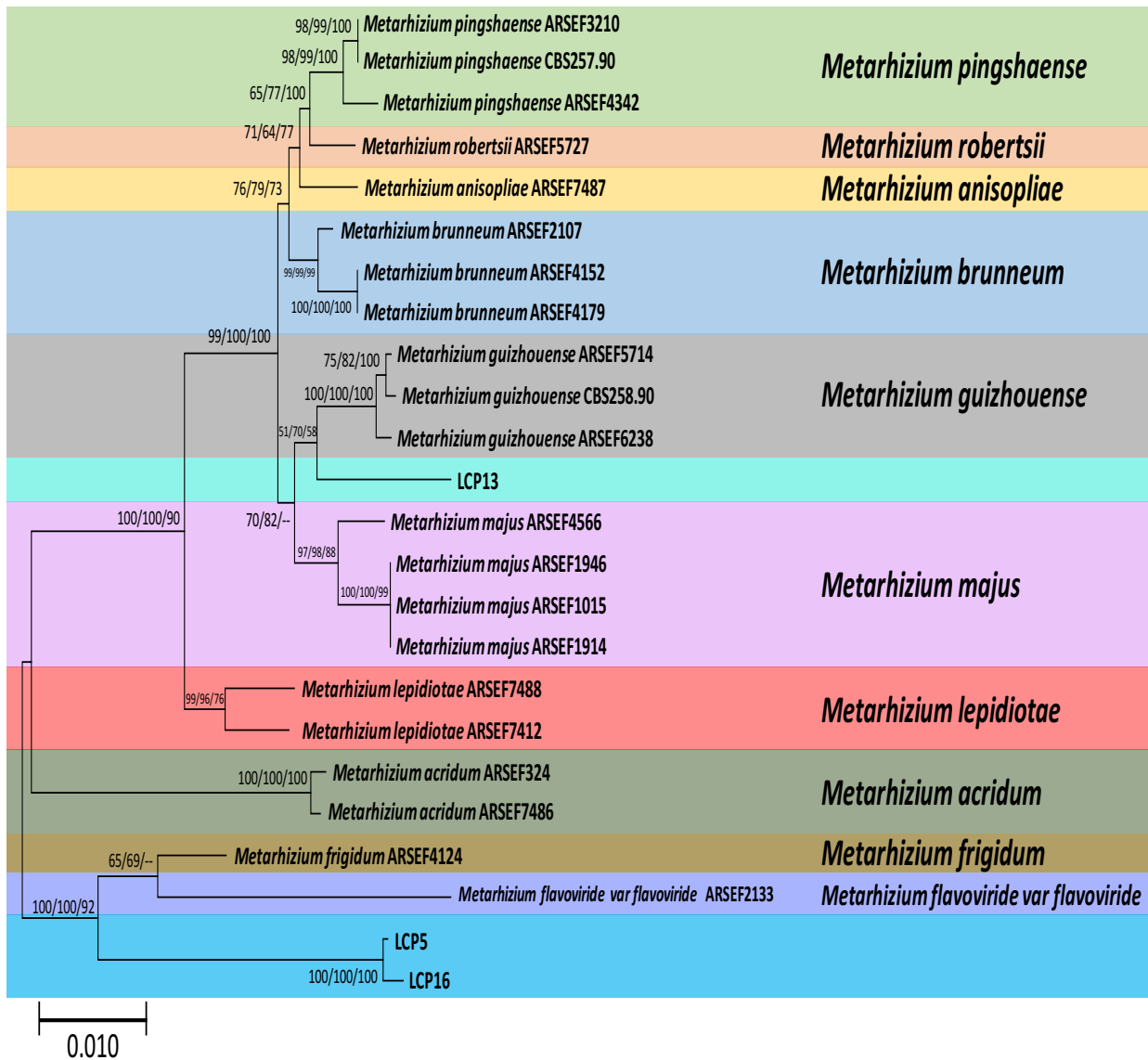


Figura 20. Árbol multigénico de los fragmentos de los genes EF-1α, βT, RPB2 y región ITS de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de bootstrap en el orden siguiente máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana.





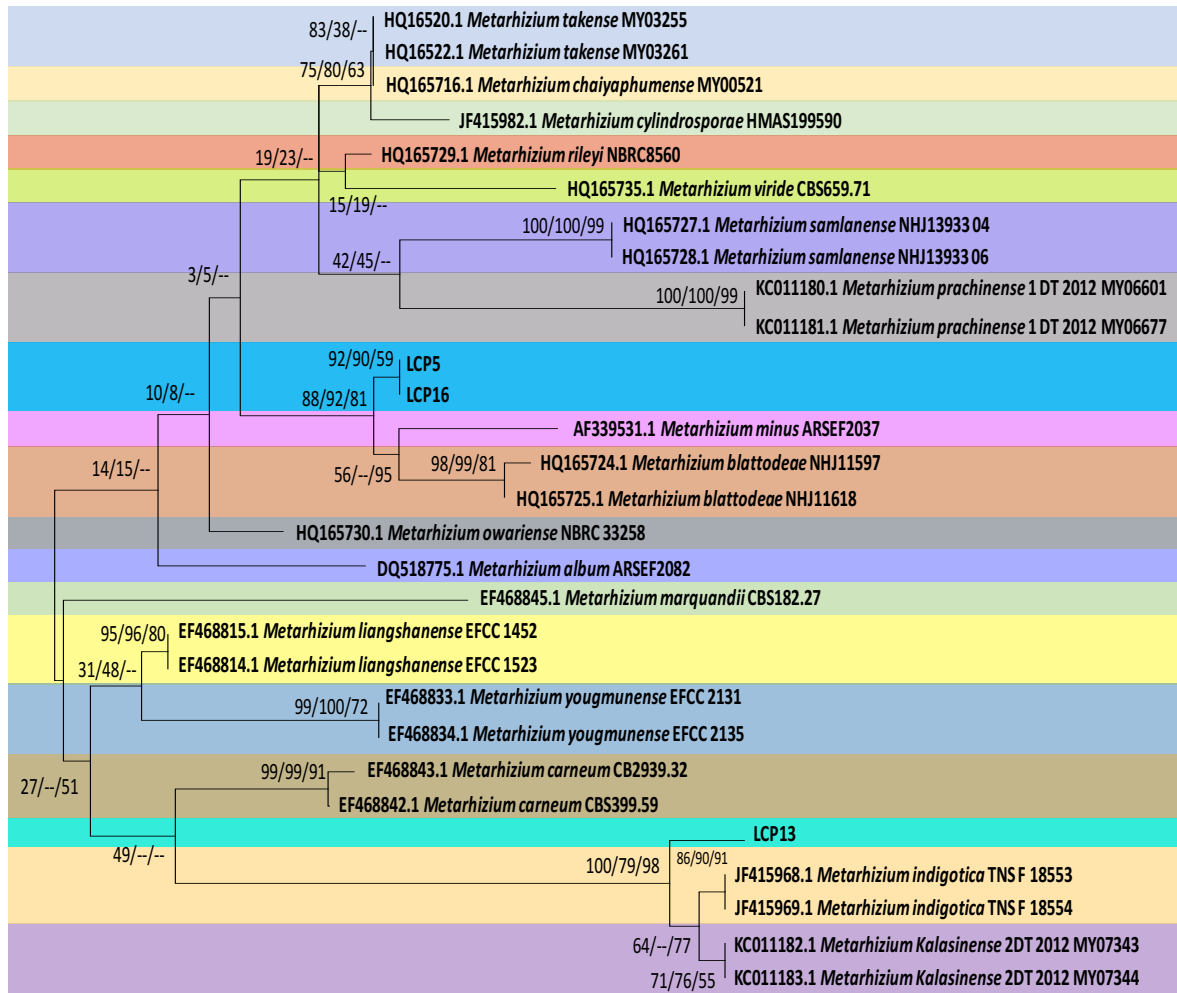
Al observar los árboles filogenéticos individuales, en ninguno de ellos los aislados se agrupan dentro de los clados de las especies reportadas. Los aislados LCP5 y LCP16 se agrupan en un nuevo clado, este clado tiene relación muy cercana con *M. flavoviride* var. *flavoviride* y *M. frigidum*, los valores de bootstrap de los tres métodos estadísticos usados es muy alto, dando un soporte muy confiable al árbol filogenético y al clado donde estos se clasifican, el cual hasta el momento no ha sido reportado.

Al observar el árbol multigénico (Figura 20), corroboramos que los aislados LCP5 y LCP16 se clasifican en un clado nuevo, por lo que se argumenta, que efectivamente estos aislados pertenecen a una nueva especie del género *Metarhizium*.

Como se observó en el árbol filogenético del fragmento del gen EF-1 $\alpha$  (Figura 14), el aislado LCP13 tiene relación filogenética más cercana con la especie *M. guizhouense*, aunque no se clasificaba dentro de este clado, al observar los demás árboles filogenéticos el aislado LCP13 presenta diferentes relaciones filogenéticas, en el árbol generado con la secuencia del gen de la Beta Tubulina y los genes de la región ITS, LCP13 presenta mayor cercanía con la especie *M. majus* (Figura 17), mientras que en árbol generado con la secuencia de RPB2 presenta una relación más cercana con *M. brunneum* y *M. anisopliae*.

En ninguno de los árboles se clasifica dentro de un clado reportado y en el árbol generado a partir del gen de la Beta Tubulina es donde presenta mayor valor de bootstrap. Al observar el árbol multigénico (Figura 20), el aislado LCP13 no se clasifica en ningún clado reportado y aunque la información de este aislado es más variada a diferencia de la que muestran LCP5 y LCP16, se puede argumentar que el aislado LCP13, se trata de otra nueva especie de *Metarhizium* relacionada muy cercanamente a *Metarhizium guizhouense*, ambas especies divergieron de un ancestro en común al separarse en dos ramas distintas del árbol filogenético del gen EF-1 $\alpha$  (Figura 14) y del árbol multigénico (Figura 20), y al tener una porcentaje de identidad de 96.8 % con *M. guizhouense* (Figura 15-E), podría tratarse de especies hermanas.

Además, se generaron los árboles filogenéticos con las secuencias de los fragmentos de los genes 28S (Figura 21) y 18S (Figura 22) y la proteasa PR1A (Figura 23).



0.005

Figura 21. Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen 28S de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de bootstrap en el orden siguiente máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana.

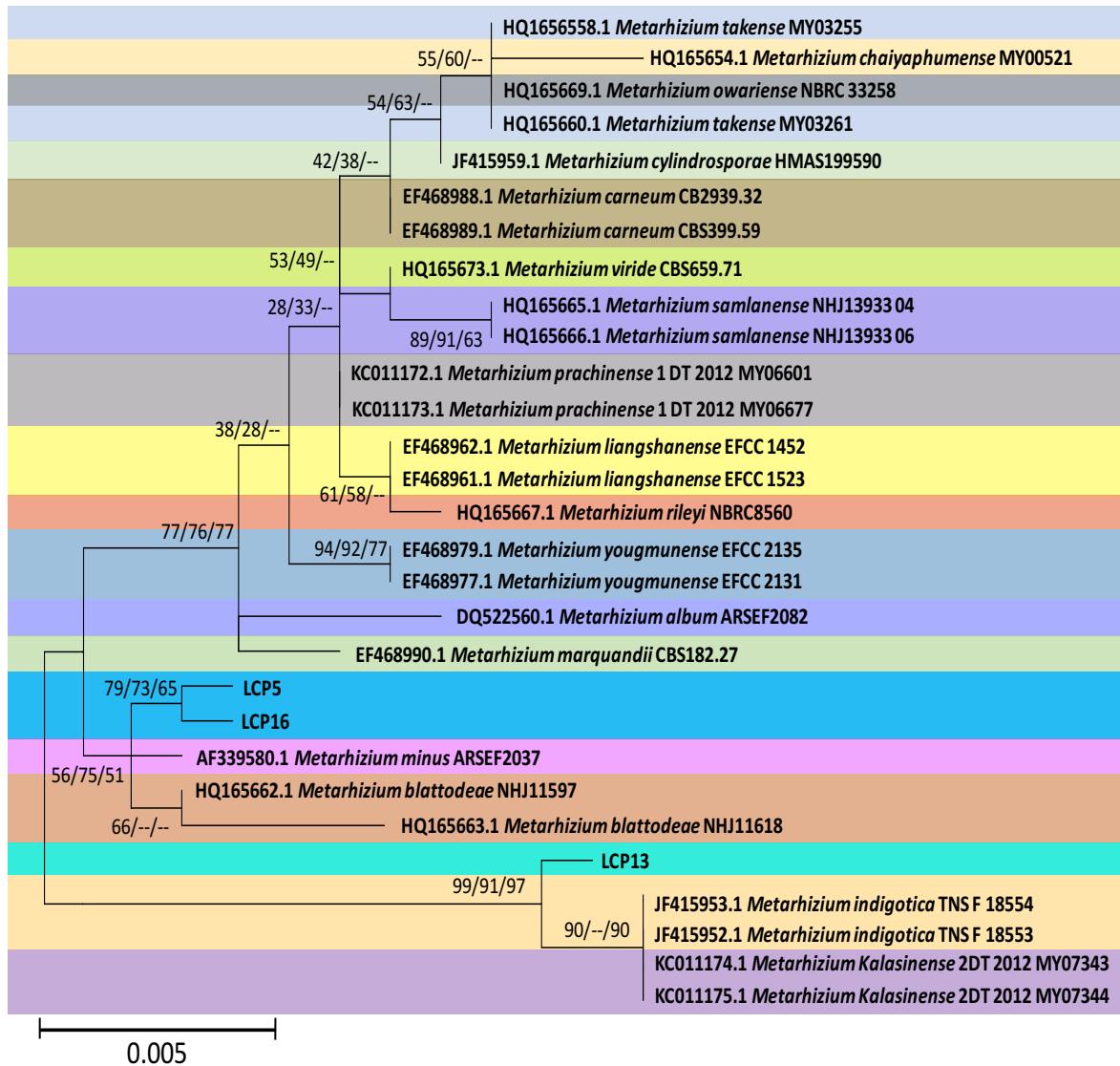


Figura 22. Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen 18S de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de bootstrap en el orden siguiente: máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana.

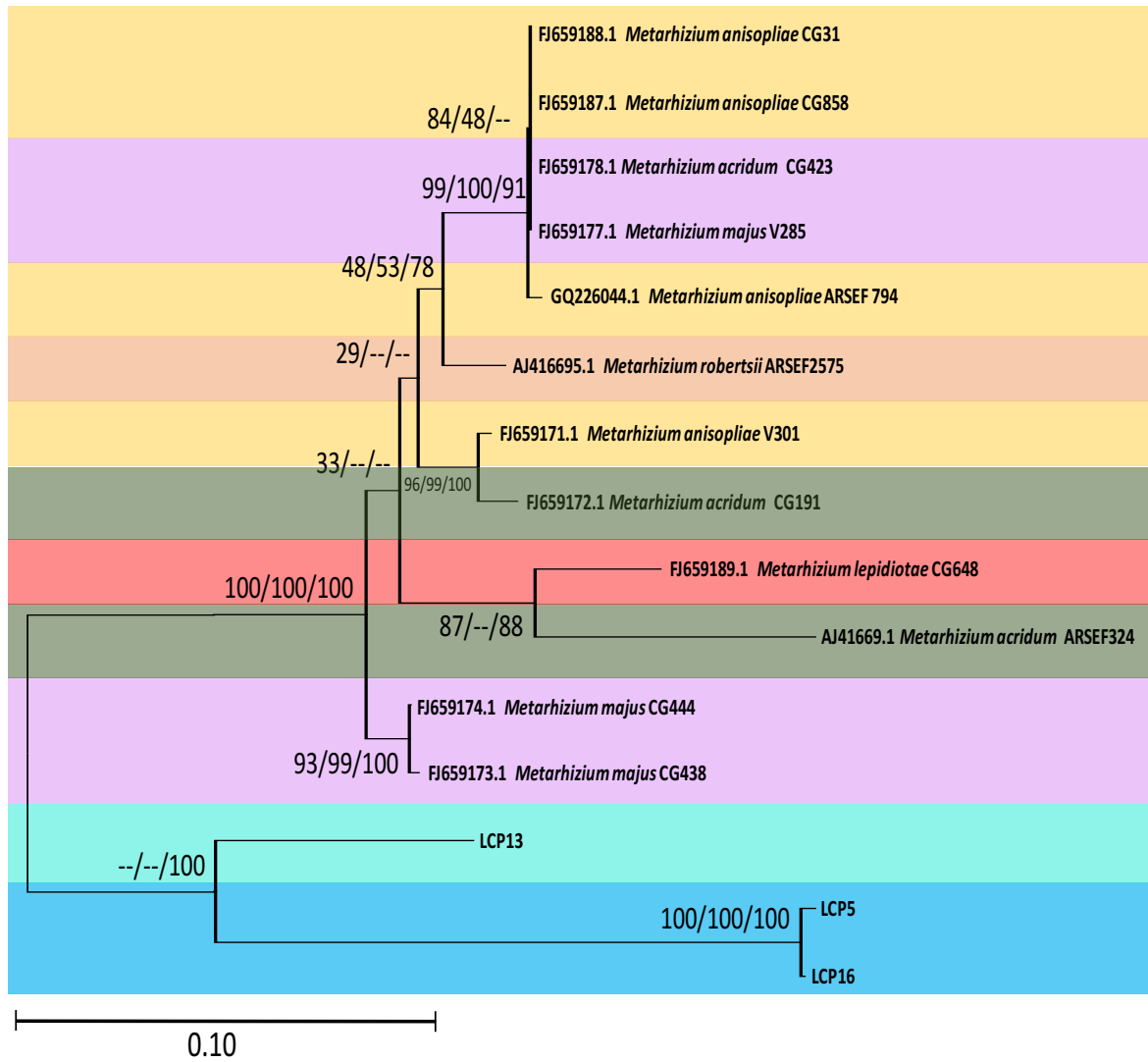


Figura 23. Árbol filogenético empleando la secuencia de un fragmento del gen PR1A de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de bootstrap en el orden siguiente máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana.



En los árboles filogenéticos de los fragmentos de los genes 28S y 18S, se comparó las secuencias de los aislados LCP5, LCP13 y LCP16 con cepas de nuevas especies de *Metarhizium* reportadas por Luangsa-ard *et al.* en el 2017. Los resultados de estos árboles arrojan información valiosa, al observar los árboles filogenéticos de los fragmentos de los genes 28S y 18S, observamos que los aislados LCP5 y LCP16 presentan relación filogenética más cercana con la especie de *Metarhizium minus*, sin embargo, los aislados LCP5 y LCP16 se clasifican en un clado distinto, dando más soporte de que los aislados pertenecen a una nueva especie. El aislado LCP13 no se clasifica dentro de alguno de los clados reportados por Luangsa-ard *et al.* en el 2017, la especie más cercana filogenéticamente al aislado es *Metarhizium indigotica*, pero claramente son dos clados diferentes, y los valores de bootstrap son altos, lo que indica que el aislado LCP13 se agrupa en un clado diferente a lo antes reportado y se trata de otra nueva especie.

En cuanto al árbol filogenético de la secuencia de un fragmento del gen de la proteasa PR1A, ninguno de los tres aislados se clasifica dentro de un clado reportado. Este se utilizaba para identificar cepas de *Metarhizium*, mediante digestión por enzimas de restricción (Leal *et al.*, 1997) o amplificando y analizando la secuencia de la proteasa (Bagga *et al.*, 2004); sin embargo, hace falta la información de las secuencias de más cepas para poder desarrollar un árbol más robusto. No se deja de lado el uso de este gen en *Metarhizium* y es útil para tener un análisis completo de las cepas.

Con la información que se obtuvo del análisis de las secuencias y la generación de los árboles filogenéticos se observó lo antes reportado por Bischoff *et al.* en el 2009, tan solo con el EF-1 $\alpha$  es más que suficiente para la resolución de las especies y el árbol multigénico corrobora la clasificación de los aislados en clados distintos a los reportados siendo los aislados LCP5 y LCP16 una nueva especie, por lo cual se propone con el nombre de *Metarhizium guanajuatense* para ambos aislados y el aislado LCP13 con el nombre *Metarhizium palomense*, debido a las regiones donde fueron aislados.

#### Características morfológicas de las nuevas especies

Adicional a la caracterización molecular también se identificó la forma de la colonia, las estructuras de conidiación y el tamaño del conidio de las nuevas especies de *Metarhizium* (Figura 24). Los aislados se crecieron en medio PDA, colocando una gota de cada aislado, se realizó de dos maneras; la primera fue colocando una gota en el centro de la placa y la segunda fue colocando 5 gotas a la misma distancia, esto se realizó para determinar si la morfología de la colonia permanecía sin cambios. Se tomó fotografía del micelio de cada aislado con una cámara AxioCam ERc 5s de Zeiss® así como de los conidios. El tamaño de los conidios se obtuvo mediante la referencia de un micrómetro para platina.



Cepa	Especie	Morfología de la colonia		Estructuras de conidiación	Tamaño del conidio
LCP5	<i>Metarhizium guanajuatense</i>				
LCP13	<i>Metarhizium palomense</i>				
LCP16	<i>Metarhizium guanajuatense</i>				

**Figura 24. Características morfológicas de las nuevas especies de *Metarhizium*.** Se muestra la morfología colonial, estructuras de conidiación y tamaño del conidio.

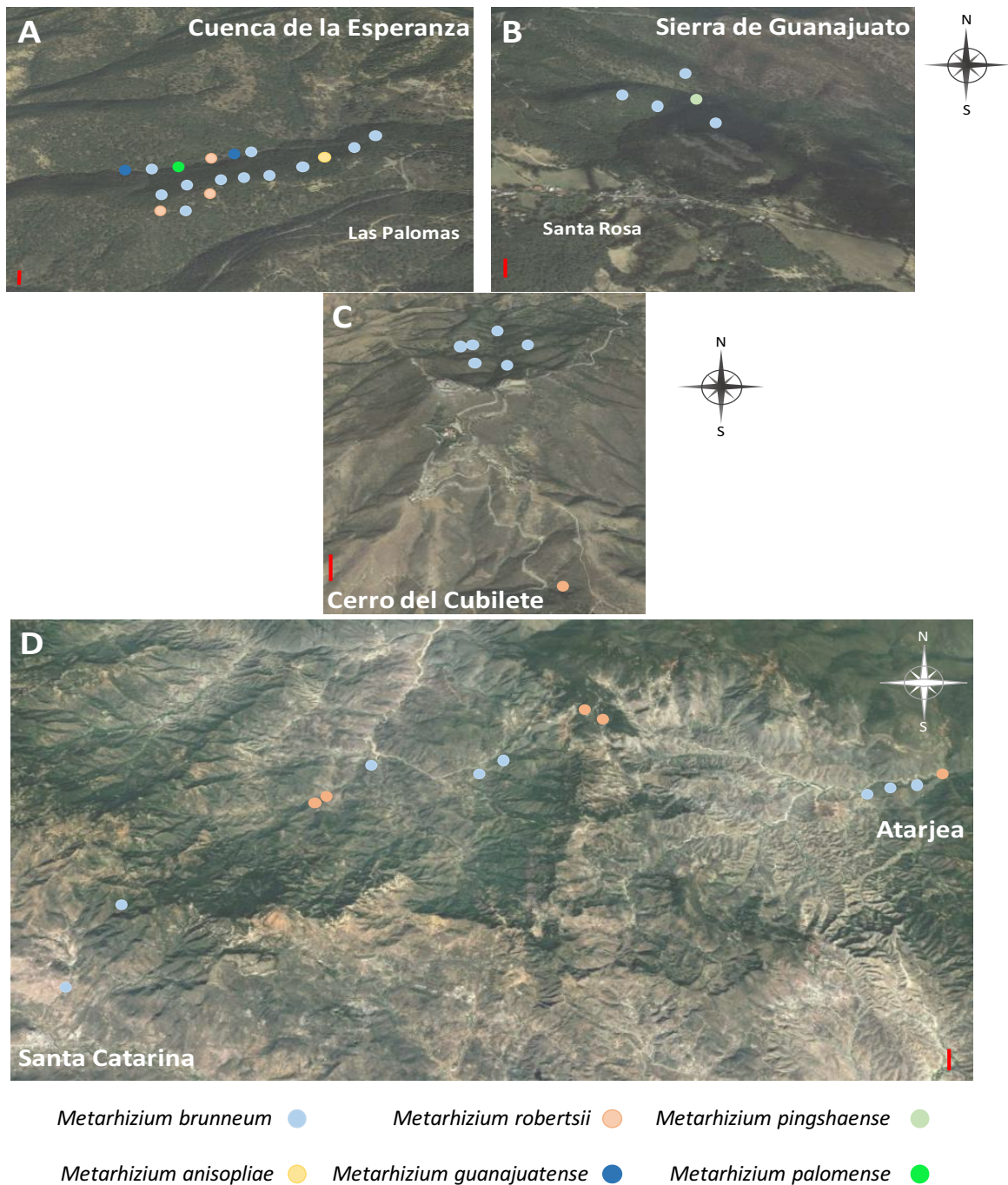
Las características morfológicas nos permiten identificar rápidamente el aislado y comparar estos rasgos con otras cepas de diferentes especies. Los aislados LCP5 y LCP16 no muestran diferencias morfológicas apreciables a simple vista, aunque pertenezcan a la misma especie, tienen variaciones en las secuencias de los fragmentos de los genes EF-1 $\alpha$ , PR1A,  $\beta$ T y región ITS, lo que nos indica que se trata de dos aislados diferentes.

Los aislados LCP5 y LCP16, tienen un color de conidio verde claro, su crecimiento y conidiación es mayor en comparación del aislado LCP13. El aislado LCP13 tiene un color de colonia verde oscuro, crece menos y genera más micelio que los aislados LCP5 y LCP16. El tamaño de los conidios es de aproximadamente 5  $\mu$ m, para los aislados LCP5 y LCP16 y conidios que van desde los 8  $\mu$ m hasta los 10  $\mu$ m para el aislado LCP13.

#### Distribución geográfica de los aislados

Es importante conocer la distribución geográfica de las especies de *Metarhizium*, para tener en cuenta la biodiversidad en las áreas naturales protegidas, de esta manera determinar cuáles aislados están mejor adaptados a distintas condiciones climáticas y del suelo, por este motivo se realizó una distribución aproximada de las especies que se encontraron en las áreas naturales protegidas (Figura 24).





**Figura 25. Distribución geográfica de los aislados de *Metarhizium*.** A) Las Palomas y Cuenca de la Esperanza, B) Sierra de Guanajuato municipio de Santa Rosa, C) Cerro del Cubilete, D) Santa Catarina y Atarjea. En A, B y C la línea roja representa 100 m de longitud aproximadamente. En D, la línea roja representa 1000 m aproximadamente. Fotos obtenidas de Google Earth Version 7.1.8.3036.



Se observa que en el área de “Las Palomas” y “Cuenca de la Esperanza” (Figura 24-A) existe un mayor número de aislados, además de un mayor número de especies del género *Metarhizium*, en esta zona se encontraron aislados pertenecientes a las especies de *M. brunneum*, *M. robertsii*, *M. anisopliae* y las dos nuevas especies *M. guanajuatense* y *M. palomense*. En la zona de la sierra de Guanajuato, cerca del municipio de Santa Rosa (Figura 24-B), el área con mayor altitud muestreada, se encontraron aislados pertenecientes a la especie *M. brunneum* y un aislado perteneciente a *M. pingshaense*.

En cuanto al cerro del Cubilete (Figura 24-C), de las zonas muestreadas se encontró solo un aislado perteneciente a la especie *M. robertsii*, los otros 6 aislados pertenecen a la especie *M. brunneum* y estos solo se encontraron en una zona de muestreo del cerro de Cubilete.

En las zonas cercanas a los municipios de Santa Catarina y Atarjea (Figura 24-D) se muestro en altitudes y climas muy diferentes, climas que van desde el semidesierto, donde se encontró un aislado de *M. brunneum*. En los bosques de pino-encino y selvas bajas se encontraron 5 aislados de *M. robertsii* y 7 aislados de *M. brunneum*, dando un total de 8 aislados de *M. brunneum* incluyendo al encontrado en la zona semidesértica.

### Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad

Sumándole a la caracterización molecular y a la distribución geográfica de los aislados, otra parte importante del estudio de *Metarhizium* es la producción de conidios, ya que es importante en su ciclo de vida, debido a que el conidio es su forma de resistencia, dispersión y el inicio del ciclo de infección hacia el insecto. En la formación de conidios, la luz juega un papel importante, donde la luz promueve un mayor crecimiento del hongo y una mayor producción de conidios (Onofre *et al.*, 2001). Gasca-Venegas en su tesis de licenciatura 2016 (Gasca-Venegas, 2016), observó que algunas cepas pertenecientes al Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, en oscuridad no producían o producían muy pocos conidios. De modo que la producción de conidios en luz y/o la oscuridad puede ser utilizado para diferenciar entre los aislados y conocer cualitativamente la capacidad de conidiar de cada uno de los aislados. Para esto se realizó una determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad de los aislados obtenidos en este trabajo (Figura 26).





Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad	Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad
PCP1 <i>M. brunneum</i>			PCP10-1.2 <i>M. brunneum</i>		
PCP2 <i>M. robertsii</i>			PCP10-1.5 <i>M. brunneum</i>		
PCP7-1 <i>M. brunneum</i>			PCP10-5 <i>M. brunneum</i>		
PCP7-2 <i>M. brunneum</i>			PCP41 <i>M. brunneum</i>		
PCP7-2.1 <i>M. brunneum</i>			PCP42-1 <i>M. brunneum</i>		
PCP10-1 <i>M. brunneum</i>			PCP42-2 <i>M. brunneum</i>		
PCP10-1.1 <i>M. robertsii</i>			PCP42-3 <i>M. brunneum</i>		

Figura 26. Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad. Se muestra el nombre del aislado y especie a la que pertenece.



Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad	Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad
PCP42-4 <i>M. brunneum</i>			LCP29-1.1 <i>M. brunneum</i>		
PCP42-5 <i>M. brunneum</i>			LCP29-1.2 <i>M. brunneum</i>		
PCP42-6 <i>M. anisopliae</i>			LCP29-2 <i>M. brunneum</i>		
LCP1CV <i>M. brunneum</i>			LCP29-2.1 <i>M. brunneum</i>		
LCP5 <i>M. guanajuatense</i>			SR7 <i>M. brunneum</i>		
LCP13 <i>M. palomense</i>			SR9CV <i>M. brunneum</i>		
LCP16 <i>M. guanajuatense</i>			SR19 <i>M. pingshaense</i>		

Figura 26. Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad (continuación). Se muestra el nombre del aislado y especie a la que pertenece.



Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad	Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad
SR23-1 <i>M. brunneum</i>			EC13-2 <i>M. brunneum</i>		
SR23-2 <i>M. brunneum</i>			EC25 <i>M. brunneum</i>		
CU3 <i>M. robertsii</i>			EC26 <i>M. robertsii</i>		
CU2-4 <i>M. robertsii</i>			ECLC2 <i>M. robertsii</i>		
CU11CV <i>M. brunneum</i>			ECLC5 <i>M. brunneum</i>		
EC7 <i>M. brunneum</i>			ECLC11-1.1 <i>M. brunneum</i>		
EC13-1 <i>M. brunneum</i>			ECLC11-1.2 <i>M. brunneum</i>		

Figura 26. Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad (continuación). Se muestra el nombre del aislado y especie a la que pertenece.





Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad	Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad
ECLC11-1.3 <i>M. brunneum</i>			AT4 <i>M. brunneum</i>		
ECLC11-2 <i>M. brunneum</i>			AT9 <i>M. brunneum</i>		
ECLC11CV <i>M. brunneum</i>			AT14-1 <i>M. robertsii</i>		
ECLC14 <i>M. robertsii</i>			AT14-2 <i>M. robertsii</i>		
AT1-1 <i>M. robertsii</i>			AT23-1 <i>M. brunneum</i>		
AT1-2 <i>M. robertsii</i>			AT23-2 <i>M. brunneum</i>		
AT3 <i>M. brunneum</i>			AT23-3 <i>M. brunneum</i>		

Figura 26. Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad (continuación). Se muestra el nombre del aislado y especie a la que pertenece.



Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad	Aislado	Fotoperiodo	Oscuridad
AT25 <i>M. robertsii</i>			STC8 <i>M. brunneum</i>		
STC4 <i>M. brunneum</i>					

Figura 26. Determinación de la capacidad de conidiación en fotoperiodo y oscuridad (continuación). Se muestra el nombre del aislado y especie a la que pertenece.

Del total de los 59 aislados, 21 de ellos no tienen la capacidad de conidiar en oscuridad, que corresponde a un 35,59 %, algunos ejemplos son PCP2, ECLC2 y AT1-1 pertenecientes a *M. robertsii*, PCP42-2, SR9CV y AT3 pertenecientes a *M. brunneum*, LCP13 de *M. palomense* y SR19 de *M. pingshaense*.

El aislado PCP2 y CU3 de *M. robertsii*, el aislado LCP16 de *M. guanajuatense* y el aislado ECLC5 de *M. brunneum*, muestran un mayor crecimiento en oscuridad que en fotoperiodo, aunque en fotoperiodo a simple vista conidian más. Mientras que otros aislados tiene el efecto contrario es decir crecen más en fotoperiodo, por ejemplo; PCP42-2, PCP42-3, EC7, LCP29-1.1, LCP29-1.2, AT23-2 y AT23-3 de *M. brunneum*, PCP42-6 de *M. anisopliae*, LCP13 de *M. palomense*, SR19 de *M. pingshaense*, AT1-2 de *M. robertsii*.

Otra característica que se observó en los aislados es que en algunos de ellos tenían diferente tonalidad en el color de la colonia, el color es distinto de la colonia en fotoperiodo en comparación con el color de la colonia en oscuridad, por ejemplo, el aislado PCP7-1, PCP7-2, PCP10-1, PCP42-1, ECLC11CV y AT23-2 de *M. brunneum*, PCP10-1.1 de *M. robertsii*, PCP42-6 *M. anisopliae*.

De los 42 aislados de *M. brunneum* que se encontraron 14 de ellos no son capaces de conidiar en oscuridad, que representa un 33.33 % del total, pero en el caso de *M. robertsii*, de los 12 aislados que se encontraron 6 de ellos no pueden conidiar en oscuridad, es decir el 50 %. Puede existir una relación entre la especie y la capacidad de conidiar en oscuridad, aunque es necesario comparar un mayor número de cepas de *M. robertsii*.



Solo uno de los aislados no conidio en fotoperiodo, que fue el aislado PCP10-1.2 de *M. brunneum*, esto es diferente a lo mostrado por los demás aislados, por lo cual es interesante investigar un poco más sobre este aislado y en general sobre esta capacidad de conidiar en oscuridad.

Estos experimentos nos permiten observar las diferencias morfológicas entre las colonias, con lo cual podemos identificar los aislados más fácilmente y rápido. Además, como se mencionó anteriormente, puede que la capacidad de conidiar en oscuridad esté relacionado con el mutualismo de plantas y de esta manera seleccionar aquel o aquellos aislados que tenga esta capacidad para realizar interacciones con las plantas.

## Caracterización del potencial para promover el crecimiento vegetal

### Bioensayos para la determinación del porcentaje de germinación

Como se ha mencionado antes *Metarhizium* promueve el crecimiento de plantas de interés agrícola, translocando nitrógeno proveniente del insecto que infecta hacia la planta (Behie *et al.*, 2012), además *Metarhizium* libera al medio nitrógeno en forma de amonio manera natural (St. Leger *et al.*, 1999) el cual podría ser utilizado por la planta como nutriente, sin embargo, esto no ha sido demostrado aún. Estudios recientes han demostrado que *Metarhizium robertsii* produce la fitohormona ácido 3-indolacético, la cual es una fitohormona tipo auxina (Liao *et al.*, 2017), que ayuda al crecimiento y proliferación de las raíces de la plantas, esta es otra manera por la cual *Metarhizium* promueve el crecimiento vegetal. Dentro de nuestro grupo de trabajo Herrera-Gutierrez en 2016 en sus tesis de licenciatura, reporta un aumento en el porcentaje de germinación de las semillas de sorgo cuando están en interacción indirecta con cepas de *Metarhizium*; y la fitohormona encargada de la germinación en plantas es el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), por lo cual se ha propuesto que *Metarhizium* pudiera estar produciendo esta fitohormona promotora del crecimiento vegetal o precursores de esta.

Para la determinación de fitohormonas se realizan bioensayos los cuales son métodos sencillos, para identificar directamente sobre la planta la fitohormona involucrada en el proceso biológico. En este trabajo los bioensayos se realizaron de la siguiente manera; se colocaron 10 semillas de sorgo de en línea recta y aproximadamente a 2 cm de las semillas se inocularon los aislados de *Metarhizium* individualmente, se probaron un total de 19 aislados obtenidos en este trabajo, esto se realizó por quintuplicado, en donde se utilizó un control negativo, colocando solo las semillas de sorgo y un control positivo usando una concentración de 50 mg/L del compuesto puro GA<sub>3</sub> Sigma® (Figura 27).

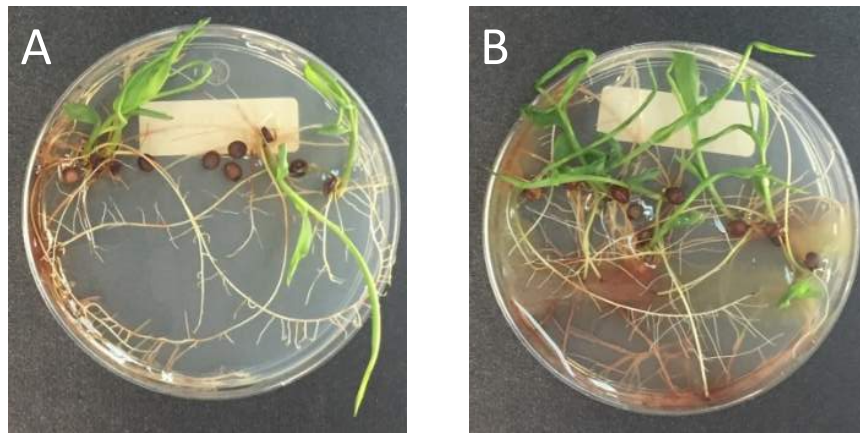


Figura 27. Germinación de las semillas de sorgo en interacción indirecta con los aislados de *Metarhizium*. Germinación de las semillas de sorgo, 10 semillas por cada caja Petri, por quintuplicado, total de 50 semillas. **A)** Germinación de las semillas de sorgo con el control negativo, germinaron un total de 29 semillas de 50. **B)** Germinación de las semillas de sorgo con el aislado SR23-1 de *Metarhizium brunneum*, germinaron un total de 40 semillas de 50.

Con los datos de germinación se puede obtener el porcentaje de germinación (Figura 28).



Figura 28. Gráfico de porcentaje de germinación de los aislados de *Metarhizium*. En naranja se muestra el porcentaje germinación del control y en verde el porcentaje de germinación del aislado SR23-1. Barras de error estándar (Tabla 8), análisis estadístico t-Student  $p < 0,05$  entre el control y el aislado SR23-1.



Se realizó el análisis estadístico de la germinación de las semillas de sorgo mediante el programa Prims 6, mediante una prueba estadística t-Student y obteniendo el error estándar. Se comparó estadísticamente el control contra todos los tratamientos individualmente (Tabla 8). El valor obtenido de la prueba estadística del aislado SR23-1 de *M. brunneum* en comparación del control negativo es  $p=0,0442$  (Tabla 8 en color rojo), lo que nos indica que el aislado tiene diferencia significativa en el porcentaje de germinación de las semillas de sorgo en comparación con el control negativo. Para los demás aislados la prueba de t-Student el valor fue de  $p>0,05$ , por lo cual el porcentaje de germinación de las semillas no es estadísticamente significativo. Mientras que el análisis t-Student entre el aislado SR23-1 y el control positivo (control con  $GA_3$ ) también muestra diferencia significativa en el porcentaje de germinación de las semillas, con valor de  $p=0,0422$ .

Tabla 8. Análisis estadístico del porcentaje de germinación de las semillas de sorgo

	Aislado	Especie	Error estándar	Valor de "p"
	Control (-) vs/ $GA_3$ 50 mg/L		0,5831	-----
			0,8124	0,7007
1	PCP2	<i>M. robertsii</i>	0,6325	0,8220
2	PCP7-1	<i>M. brunneum</i>	0,4899	0,4542
3	PCP7-2	<i>M. brunneum</i>	0,5099	0,3324
4	PCP7-2.1	<i>M. brunneum</i>	0,5831	0,2598
5	PCP10-1.1	<i>M. robertsii</i>	0,7483	0,2436
6	PCP42-2	<i>M. brunneum</i>	0,400	0,2947
7	PCP42-5	<i>M. brunneum</i>	0,5831	0,4876
8	PCP42-6	<i>M. anisopliae</i>	1,327	0,8952
9	LCP1CV	<i>M. brunneum</i>	0,9695	0,6134
10	LCP5	<i>M. guanajuatense</i>	0,8124	0,8470
11	LCP13	<i>M. palomense</i>	0,9798	0,5072
12	LCP16	<i>M. guanajuatense</i>	0,4899	> 0,999
13	LCP29-1.1	<i>M. brunneum</i>	0,5099	0,6198
14	SR7	<i>M. brunneum</i>	0,7483	0,8386
15	SR9CV	<i>M. anisopliae</i>	0,6782	0,5216
16	SR19	<i>M. pingshaense</i>	0,7348	0,1284
17	SR23-1	<i>M. brunneum</i>	0,7071	0,0442
18	SR23-2	<i>M. brunneum</i>	1,200	0,6693

Los resultados nos indican que el aislado SR23-1, es el aislado que induce más la germinación de las semillas de sorgo, el aislado puede estar produciendo giberelinas o tener mayor efecto en la inducción de la germinación de las semillas de sorgo que una concentración de 50 mg/L de  $GA_3$ .





## DISCUSIÓN

El aislamiento de hongos entomopatógenos autóctonos es esencial para proporcionar una visión de la biodiversidad fúngica natural y para proporcionar un grupo de potenciales agentes de control biológico o promotores de crecimiento de plantas (Jackson *et al.*, 2000). Es importante la comprensión de los parámetros que determinan la diversidad y distribución de las especies de hongos entomopatógenos en el suelo ya que ayudaría a identificar las especies más adecuadas para un ambiente particular y mejoraría la eficacia del control biológico o la promoción de crecimiento de plantas (Quesada-Moraga *et al.*, 2007).

Un hongo entomopatógeno ampliamente usado como biocontrolador de insectos plaga en la agricultura, conocido desde hace más de 100 años es el hongo *Metarhizium* (Roberts y St. Leger, 2004). Una vez que termina su ciclo patogénico hacia el insecto, muchas especies de *Metarhizium* habitan en el suelo durante una parte significativa de su ciclo de vida (Keller y Zimmerman, 1989). Sin embargo, estudios recientes indican una mayor importancia en su rol ecológico asociado a la rizósfera de las plantas (Hu y St. Leger, 2002). El rol ecológico que presenta *Metarhizium* con las plantas ha sido recientemente objeto de diversos estudios, dentro de los principales resultados se encuentra que existe un mutualismo entre *Metarhizium* y las plantas, el hongo transloca nitrógeno derivado de insectos infectados hacia la planta, mientras que la planta le transfiere al hongo, compuestos carbonados que libera a la rizósfera (Behie y Bidochka, 2012; Behie *et al.*, 2017).

Además, se ha demostrado que *Metarhizium* puede asociarse a las raíces de las plantas y no es necesario que infecte al insecto para producir un efecto benéfico hacia estas, en interacciones con las plantas de interés agrícola; cebolla, maíz, frijol, soya y sorgo se obtiene un mayor crecimiento de la plántula, raíz principal, raíces laterales y mayor peso seco en el fruto (Behie y Bidochka, 2015; Liao *et al.*, 2014; Herrera-Gutierrez, 2016; Maniania *et al.*, 2003). No es necesario que *Metarhizium* colonice la raíz, ya que los compuestos volátiles pueden inducir la formación de raíces laterales en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Cabrera-Rangel, 2016). Estas interacciones pueden explicarse, dado que *Metarhizium* está relacionado filogenéticamente con los hongos endófito de pastos *Claviceps* y *Ephicloë* sugiriendo un posible origen de la asociación de *Metarhizium* con plantas (Spatafora *et al.*, 2007).

En este trabajo se obtuvieron aislados de *Metarhizium* de diferentes áreas naturales del estado. De las muestras colectadas, se obtuvieron un total de 59 aislados, todos diferentes, lo cual indica la gran diversidad de *Metarhizium* en estas áreas naturales. Las Palomas,



Cuenca de la Esperanza y la sierra de Guanajuato municipio de Santa Rosa son tres zonas muy cercanas, pero con diferencias marcadas entre climas y tipo de vegetación. En estas zonas se encontró un total de 30 aislados, más de la mitad obtenidas en este trabajo. Mientras que en el cerro del Cubilete y Atarjea se obtuvieron 16 y 11 aislados respectivamente, en Santa Catarina solo se obtuvieron 2 aislados.

En donde se encontró la mayor diversidad fue en la zona de Cuenca de la Esperanza y las Palomas con 4 especies diferentes las cuales fueron; *M. brunneum*, *M. robertsii*, *M. anisopliae* y dos de ellas que con los análisis realizados de las secuencias de los fragmentos de los genes  $\beta$ T, RPB2, 28S, 18S, PR1A y la región ITS, se demostró se tratan de dos nuevas especies de *Metarhizium*, a las cuales se les nombro *Metarhizium guanajuatense* y *Metarhizium palomense*, debido a la zona donde se aisló, como se reportan la taxonomía de nuevas especies por Luangsa *et al.* en este año, donde usa la raíz del nombre del lugar donde se aisló y el sufijo "ense", de esta manera se propusieron los nombres a las nuevas especies; *M. guanajuatense*, por la zona al norte de la ciudad de Guanajuato, en la sierra con el mismo nombre y *M. palomense*, por la zona de educación ambiental denominado "Las Palomas" dentro del área natural protegida Cuenca de la Esperanza. Además de obtener estas cuatro especies en la zona de Santa Rosa se obtuvo un aislado de *M. pingshaense*. En general en estas zonas se obtuvieron más aislados de *M. brunneum* con un total de 42; 12 aislados de *M. robertsii*, 1 aislado de *M. pingshaense*, 1 aislado de *M. anisopliae*, 2 aislados de *M. guanajuatense* y 1 aislado de *M. palomense*. Los aislados obtenidos de las zonas más altas (Cuenca de la Esperanza, Santa Rosa y cerro del Cubilete), puede ser que están mejor adaptados a condiciones frías o templadas que a cálidas, debido al clima frío de estas zonas. Cerca del municipio de Santa Catarina se obtuvo un aislado de una zona semidesértica, STC4 de *M. brunneum*, el cual puede que tenga mayor resistencia a la sequía, temperaturas más cálidas y la luz ultravioleta, debido a las condiciones climáticas secas y la cantidad de exposición solar de donde fue aislado, por lo cual este aislado pueda ser usado en zonas agrícolas secas.

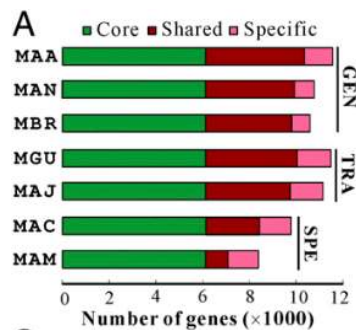
Comparando los resultados de este trabajo con estudios hechos en Canadá por Wyrebek *et al.* en 2011, usando un medio de selección con dodina, de 200 muestras de raíz se obtuvo un 51 % de aislados de *Metarhizium*, obteniendo muy buenos resultados, aunque en el trabajo de Wyrebek *et al.*, también se tomaron muestras en zonas agrícolas, por lo cual se pudo haber aislado alguna cepa de *Metarhizium* comercial que fue usada anteriormente en estas zonas, se reportan la presencia de aislados de las especies de *M. brunneum*, *M. guizhouense* y *M. robertsii*.



Trabajos similares a este se han realizado en otras partes del mundo por ejemplo España y Dinamarca (Keyser *et al.*, 2015). En España se reporta la existencia de un 7.3 % de aislados de *Metarhizium*, de 244 muestras solo se encontraron 17 aislados (Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Mientras que trabajos de aislamiento en el estado de Guanajuato reportan 9 aislados obtenidos de 165 muestras en zonas agrícolas (Pérez-González, *et al.*, 2014). En estos trabajos, el método de aislamiento es mediante la utilización de insectos carnada. Mediante esta técnica, el aislamiento de *Metarhizium* fue muy bajo en comparación con los aislados obtenidos en este trabajo, los cuales fueron 59 aislados de 206 muestras tomadas, siendo un 28,64 %, esto indica la eficiencia del método de aislamiento utilizado. Además, en el trabajo realizado en el estado de Guanajuato por Pérez-González, *et al.* en el 2014, fue solo en zonas agrícolas, en donde la utilización de agroquímicos ha disminuido la población de microorganismos presentes en el suelo.

Tener una cepa totalmente caracterizada ha ayudado a rastrear las cepas introducidas en el medio ambiente, evaluar sus posibles efectos sobre las poblaciones nativas de *Metarhizium* y/o caracterizar los cultivares (Mayerhofer *et al.*, 2015). La caracterización molecular ha sido ampliamente usada en *Metarhizium*. Driver *et al.* en el 2000, realizaron un análisis filogenético para las especies de *Metarhizium* en base a las secuencias de la región ITS; sin embargo, se observa una falta de resolución provista por este análisis, ya que no se pudo dar una buena clasificación de dos especies, las que se nombró como sinónimos a *Metarhizium anisopliae* var. *frigidum* y *Metarhizium flavoviride*. Sin embargo, sus características morfológicas eran muy distintas. Posteriormente gracias al trabajo de Bischoff *et al.* en el 2006, en base al análisis del factor de elongación 1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), se pudo identificar que se trataba de dos especies diferentes, estrechamente relacionadas filogenéticamente. En el 2009 Bischoff *et al.*, se dieron a la tarea de clasificar las especies en base al gen EF-1 $\alpha$  y otros mencionados en su trabajo (RPB1, RPB2 y Bt), donde concluye que con la utilización del gen EF-1 $\alpha$  es más que suficiente para lograr una buena clasificación de las especies del hongo *Metarhizium*. Desde entonces, esta clasificación ha sido ampliamente usada para la determinación de especie del hongo *Metarhizium* (Bischoff *et al.*, 2009; Wyrebek *et al.*, 2011; Carrillo-Benítez *et al.*, 2013; Luangsa-ard *et al.*, 2017).

En primera instancia el tener identificado las especies es importante porque nos proporciona información sobre el posible orden de insecto que puede infectar ya que las especies de *Metarhizium* han divergido y formado especies que son especialistas o generalistas hacia su insecto hospedero (Figura 29).



**Figura 29.** Número de genes de las especies de *Metarhizium*. Las especies específicas son *Metarhizium álbum* (MAM), *Metarhizium acridum* (MAC). Las especies transicionales son *Metarhizium majus* (MAJ), *Metarhizium guizhouense* (MGU). Las especies Generalistas son *Metarhizium brunneum* (MBR), *Metarhizium anisopliae* (MAN) y *Metarhizium robertsii* (MAA) (Hu *et al.*, 2014).

Las especies generalistas tiene mayor cantidad de genes que las especialistas, estos genes le dan mayor variabilidad para infectar gran cantidad de insectos, contrario a las especialistas (Hu *et al.*, 2014). Las especies de *Metarhizium* adquieren diversos genes de bacterias y arqueas e incluso artrópodos, plantas y vertebrados. Las especies no especializadas han obtenido más genes bacterianos que las especialistas (Hu *et al.*, 2014), estos genes adquiridos por el hongo pueden ser provenientes de bacterias promotoras del crecimiento, o genes de plantas implicados en la síntesis de fitohormonas como auxinas y giberelinas, de esta manera la identificación de especie de *Metarhizium* nos da también un método de selección adecuado de la cepa, al momento de su aplicación en los campos agrícolas, ya sea como entomopatógeno o como promotor de crecimiento vegetal.

Comparando las secuencias de los aislados obtenidos, podemos concluir que todos los aislados son diferentes entre sí, aunque provengan de una misma muestra, son distintos, inclusive en una misma muestra se encontraron especies diferentes, esto denota la gran preservación de los ecosistemas donde se muestreo, en comparación de otros trabajos donde el número de especies obtenidas era muy bajo (Quesada-Moraga *et al.*, 2007; Tae-Young *et al.*, 2010; Pérez-González *et al.*, 2014; Mayerhofer *et al.*, 2015).

La importancia de la biodiversidad del hongo *Metarhizium* radica en el conjunto de datos proporcionados con la caracterización molecular, complementada con un entendimiento del ambiente, en el que se obtuvieron los aislados de este trabajo y de otros trabajos similares realizados anteriormente, por ejemplo el trabajo realizado por Pérez-González en el 2014, para seleccionar aquellos aislados o cepas mejor adaptada al entorno en el que se van a usar en la agricultura y de esta manera cumplan su función óptima, ya sea como biocontrolador de insectos plaga o biofertilizante.



Además, en este trabajo complementando los resultados obtenidos del lugar donde se obtuvieron los aislados y la caracterización molecular, se evaluó la capacidad de los aislados de *Metarhizium* de conidiar en la oscuridad. Se sabe que la luz juega un papel importante en la formación de conidios donde la luz promueve un mayor crecimiento del hongo y una mayor producción de estos (Onofre *et al.*, 2001). Además, la luz proporciona información a las células fúngicas en crecimiento, le da al hongo indicios de si se encuentra en el suelo, dentro de un hospedero o si se encuentra a la intemperie expuesto a factores causantes de estrés, todos estos aspectos son de vital importancia para su supervivencia y la dispersión de las especies de hongos en el ambiente (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007). La conidiación en *Metarhizium* es importante, ya que esta es su forma infectiva hacia el insecto; *Metarhizium* produce una proteína de adhesión *MAD1* para adherirse al insecto hospedero, y una proteína *MAD2* para adherirse a las plantas (Wang y St. Leger, 2007), estas proteínas se encuentran en la pared del conidio de *Metarhizium*. Se ha reportado que algunas cepas de *Metarhizium* tienen la capacidad de conidiar en oscuridad (Gasca-Venegas, 2016) esto le puede otorgar ciertas ventajas sobre las demás, ya que tiene una mayor dispersión o mayor capacidad de permanecer en la rizósfera. El tener determinado la capacidad de conidiar en oscuridad y como conidian en fotoperiodo (color, forma distintiva o si forma anillos de conidiación), es una manera rápida y sencilla de distinguir entre los aislados, y junto con la caracterización molecular; se tiene una caracterización más completa de cada cepa.

Del total de los 59 aislados, 21 de ellos no tienen la capacidad de conidiar en oscuridad, que corresponde a un 35,59 %. No se encontró una relación entre la especie y su capacidad de conidiar en oscuridad, aunque existía un mayor porcentaje de aislados de *M. brunneum* que conidiaban en oscuridad en comparación de *M. robertsii*, sin embargo, es necesario aumentar el número de aislados o cepas a analizar de *M. robertsii*. Tal vez esta capacidad de se adquirió al estar un mayor tiempo en interacción con planta (en la rizósfera) que en el estilo de vida entomopatógeno, es decir permanecía más debajo de la tierra, esta característica podría ser importante al momento de seleccionar alguna cepa para determinar su uso en la agricultura, si se usa como biofertilizante o como biocontrolador de plagas.

Por otra parte estudios dentro de nuestro grupo de trabajo de Herrera Gutiérrez en el 2016 en su tesis de licenciatura, demostró que *Metarhizium*, en un ambiente semicontrolado, incrementa la capacidad de germinación de las semillas de *S. vulgare*, y está asociado a las raíces de la plántulas, dicha asociación induce el aumento de la longitud de la plántula, en particular la asociación entre *S. vulgare* con la cepa CARO19 de *M. brunneum* aumenta el crecimiento total de la planta, obteniendo hasta un 300 % más de crecimiento en interacción por 14 días. Estos datos sugieren que cepas del hongo *Metarhizium* podría estar secretando fitohormonas de crecimiento, como las giberelinas; esta es una fitohormona



promotora del crecimiento vegetal, y la cual esta reportada que induce la germinación al agregarla de manera exógena en semillas de sorgo (Steinbach *et al.*, 1997), hay 136 giberelinas (GAs) aisladas de plantas, producidas por microorganismos como hongos y bacterias u obtenidas sintéticamente (Rodriges *et al.*, 2012). Las giberelinas activan en la planta una serie de genes cuyos efectos se pueden observar en el debilitamiento del endospermo, activan proteínas modificadoras de la pared celular, la activación de enzimas hidrolíticas, especialmente como las  $\alpha$ -amilasa y proteasas; así como enzimas que modifican la pared como endotransglicolasas y expansinas, resultando en la germinación de las semillas. Además, las giberelinas están implicadas en la elongación del tallo (Miransari y Smith, 2014).

En este trabajo se realizó un bioensayo con semillas de sorgo, las cuales son muy susceptibles a las giberelinas, determinando el porcentaje de germinación de las semillas. El aislado SR23-1 de *Metarhizium brunneum* mostro una inducción de la germinación de las semillas de sorgo de un 80 %, mientras que el control solo fue de 58 %, un aumento del 22 % de la germinación de las semillas. Los valores fueron significativos con un valor de  $p=0,0432$ .

Los bioensayos son un parámetro importante, aunque no indican si el efecto observable es por el ácido giberélico producido por el hongo, o el hongo induce a la planta a producir el ácido giberélico. Sumando a lo anterior *Metarhizium* libera amonio naturalmente al medio (St. Leger *et al.*, 1999), el cual puede ser sentido por la semilla y desencadenar la germinación (Miransari y Smith, 2014).

Por los datos reportados y los del grupo de trabajo, la promoción del crecimiento de plantas por parte de *Metarhizium* es multifactorial, este hongo puede beneficiar a la planta de distintas maneras, como antes lo mencionamos produce ácido 3-indolacético (Liao *et al.*, 2017) que es una fitohormona encargada de la proliferación de raíces laterales, y puede que *Metarhizium* esté produciendo fitohormonas que inducen la germinación, las cuales pueden ser giberelinas o puede estar beneficiándolas de otra manera, ya sea liberando enzimas que ayudan a las plantas como celulasas, hemicelulasas y expansinas.

*Metarhizium* es un hongo que se puede utilizar como una herramienta biotecnológica en la agricultura no solo como bioinsecticida, sino también como biofertilizante, el cual no se está aprovechando eficientemente. Estudios como los de este trabajo nos ayuda a comprender más sobre la ecología y aprovechamiento del hongo *Metarhizium*; su biodiversidad, funciones e interacciones con la rizósfera, y con estos conocimientos se puede llegar a un mejor entendimiento sobre las especies de *Metarhizium* y de esta manera llevar a un uso eficiente del hongo para aumentar los rendimientos de los cultivos agrícolas de la región.



## CONCLUSIONES

- En los micro ecosistemas del estado de Guanajuato se obtuvieron 59 aislados de *Metarhizium*, los cuales analizando su secuencia se determinó que 42 de ellos corresponden a *Metarhizium brunneum*, 12 a *Metarhizium robertsii*, 1 a *Metarhizium pingshaense* y 1 a *Metarhizium anisopliae*.
- Tres de los aislados no se pudieron clasificar en ningún clado reportado, con los análisis de los fragmentos de los genes de  $\beta T$ , RPB2, 28S, 18S, PR1A y región ITS, se pudo corroborar que se trata de dos nuevas especies de *Metarhizium*, las cuales se les propuso el nombre de *Metarhizium guanajuatense* y *Metarhizium*, que corresponden a 2 aislados de *Metarhizium guanajuatense* y 1 aislado de *Metarhizium palomense*.
- Ninguna secuencia de los aislados muestra una identidad de 100 % en la secuencia del EF-1 $\alpha$ , con otro de los aislados, por lo cual se consideran aislados distintos.
- El aislado SR23-1 de *Metarhizium brunneum* indujo un mayor porcentaje de germinación de las semillas de sorgo, con un 80 % de germinación de las semillas, mostrando un 22 % más de germinación de que el control sin interacción con los aislados de *Metarhizium*.





## PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de los aislados obtenidas en este trabajo en interacción con plantas en condiciones semicontroladas en “invernadero”
- Evaluar el efecto la promoción del crecimiento de los aislados en diferentes plantas de interés agrícola.
- Evaluar el efecto antagónico de los aislados en contra de organismos fitopatógenos.
- Evaluar la compatibilidad de los aislados con los agroquímicos más empleados en la región.
- Evaluar la patogenicidad de los aislados hacia insectos plaga.
- Determinar si los aislados puedan estar produciendo ácido giberélico, mediante la técnica analítica de HPCL.

CONFIDENCIAL



## BIBLIOGRAFÍA

- **Bagga, S., Hu, G., Screen, S. E., & Leger, R. J. S.** Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 2004, 324, 159-169.
- **Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol* 2006; 57, 233-266.
- **Barradas, V.** *Instrumentación Biometeorológica*. México, Ediciones Científicas Universitarias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)/Fondo de Cultura Económica (FCE); 1994.
- **Behie, S. W., & Bidochka, M. J.** Insects as a Nitrogen Source for Plants. *Insects* 2013; 4(3), 413-424.
- **Behie, S. W., Jones, S. J., Bidochka, M. J.** Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology* 2015; 13, 112-119.
- **Behie, S. W., Moreira, C. C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P. M., & Bidochka, M. J.** Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nature Communications* 2017. 8.
- **Behie, S. W., Padilla-Guerrero, I. E., Bidochka, M. J.** Nutrient transfer to plants by phylogenetically diverse fungi suggests convergent evolutionary strategies in rhizospheric symbionts. *Communicative & integrative biology* 2013; 6(1), e22321.
- **Behie, S. W., Zelisko, P. M., Bidochka, M. J.** Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 2012; 336(6088), 1576-1577
- **Beilharz, V. C., Parbery, D. G., & Swart, H. J.** Dodine: a selective agent for certain soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 1982., 79(3), 507-511.
- **Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A. et al.** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS biology* 2006; 4(7), e226.
- **Bidochka, M. J., Menzies, F. V., & Kamp, A. M.** Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Archives of Microbiology* (2002). 178(6), 531-537.
- **Bischoff, J. F., Rehner, S. A., Humber, R. A.** *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia* 2006; 98(5), 737-745.



- **Bischoff, J. F., Rehner, S. A., Humber, R. A.** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 2009; 101(4), 512-530.
- **Boucias, D. G., Pendland, J. C., Latge, J. P.** Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and environmental microbiology* 1988; 54(7), 1795-1805.
- **Cabrera Rangel José Francisco.** Identificación de fitohormonas producidas por aislados Mexicanos del hongo *Metarhizium* spp; Tesis de licenciatura, Universidad de Guanajuato, 2016.
- **Cameron DD, Leake JR, & Read DJ.** Mutualistic mycorrhiza in orchids : evidence from plant – fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol.* 2006, 171, 405-416.
- **Carrillo-Benítez, M. G., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., & Enríquez-Vara, J. N.** Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microbial ecology* 2013. 65(2), 437-449.
- **Chapin, F.S., O. E. Sala, E. Huber- Sannwald** (eds.). *Global biodiversity in a changing environment: scenarios for the 21st century/editors. Ecological Studies* (152), Library of Congress, Springer; 2001.
- **Charnley, A. K., St Leger, R. J.** The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In *The fungal spore and disease initiation in plants and animals* 1991 (pp. 267-286). Springer US.
- **Cruz, A., Becerril, R., y Báez, O.** La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato.(IEE);* 2012.
- **Driver, F., Milner, R. J., Trueman, J. W.** A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 2000; 104(2), 134-150.
- **Enkerli, J., Widmer, F.** Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. *BioControl* 2010; 55(1), 17-37.
- **Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Rangel, D. E., Foster, R. N., Roberts, D. W.** CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological control* 2010; 54(3), 197-205.
- **Gasca Venegas Abraham Asahel.** Estudio de la conidiación en respuesta a un estímulo luminoso en *Metarhizium* spp.; Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato, 2016.



- **Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N. et al.** FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* 2004; (pp. 473-479). Springer Netherlands.
- **Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M.** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* 2008, 312(1-2), 7-14.
- **Herrera-Estrella A, Horwitz BA.** Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol Microbiol.* 2007 Apr;64(1):5-15.
- **Herrera Gutiérrez Luz Janeth.** Evaluación de la interacción de cepas de *Metarhizium* con *Sorghum vulgare*.; Tesis de licenciatura, Universidad de Guanajuato, 2016.
- **Hu, G., y St Leger, R. J.** Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, 68(12), 6383-6387.
- **Hu, X., Xiao, G., Zheng, P., Shang, Y., Su, Y., Zhang, X., ... & Wang, C.** Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014. 111(47), 16796-16801.
- **Huang, B., Li, C., Humber, R. A., Hodge, K. T., Fan, M., Li, Z.** Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Mycotaxon* 2005; 94, 137-148.
- **Jackson TA, Alves SB, Pereira RM,.** Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. In: Gurr G, Wratten S (eds), *Biological Control: measures of success*. Kluwer Academic Press, London 2000, pp. 271–296.
- **Javot, H., Penmetsa, R. V., Breuillin, F., Bhattarai, K. K., Noar, R. D. et al.** *Medicago truncatula* mtpt4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* 2011; 68(6), 954-965
- **Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O. et al.** Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 2011; 333(6044), 880-882.
- **Keller S, Zimmerman G.** Mycopathogens of soil insects. In: Wilding N, Collins NM, Hammond PM, Webber JF (eds), *Insect– Fungus Interactions*. Academic Press, London, 1989 pp. 239–270.
- **Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F., & Rehner, S. A.** Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 2014, 106(4), 811-829.



- **Leal, S. C., Bertioli, D. J., Butt, T. M., Carder, J. H., Burrows, P. R., & Peberdy, J. F.** Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. *Mycological Research* 1997, 101(3), 257-265.
- **Lee, H. W., Nguyen, T. T. T., Mun, H. Y., Lee, H., Kim, C., & Lee, H. B.** Confirmation of two undescribed fungal species from Dokdo of Korea based on current classification system using multi loci. *Mycobiology*, 2015, 43(4), 392-401.
- **Liao, X., Fang, W., Lin, L., Lu, H. L., St Leger, R. J.** *Metarhizium robertsii* produces an extracellular invertase (MrINV) that plays a pivotal role in rhizospheric interactions and root colonization. *PLoS one* 2013; 8(10), e78118.
- **Liao, X., Lovett, B., Fang, W., & St Leger, R. J.** *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in Arabidopsis and enhances virulence to insects. *Microbiology* 2017.
- **Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., Leger, R. J. S.** The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied microbiology and biotechnology* 2014; 98(16), 7089-7096.
- **Luangsa-ard, J. J., Mongkolsamrit, S., Thanakitpipattana, D., Khonsanit, A., Tسانathai, K., Noisripoom, W., & Humber, R. A.** Clavicipitaceous entomopathogens: new species in *Metarhizium* and a new genus *Nigelia*. *Mycological Progress* 2017, 16(4), 369-391.
- **Maniania NK, Sithanatham S, Ekesi S, Ampong-Nyarko K, Baumgärtner J, Löhr B, Matoka CM.** A field trial of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for control of onion thrips, *Thrips tabaci*. 2003. *Crop Prot* 22(3):553-559
- **Mayerhofer, J., Lutz, A., Widmer, F., Rehner, S. A., Leuchtman, A., & Enkerli, J.** Multiplexed microsatellite markers for seven *Metarhizium* species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 132, 132-134.
- **Milner, R. J., Hunter, D. M.** Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. *Journal of Orthoptera Research* 2001; 10(2), 271-276.
- **Miransari, M., & Smith, D. L.** Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 2014. 99, 110-121
- **Montalva, C., Collier, K., Rocha, L. F. N., Inglis, P. W., Lopes, R. B., Luz, C., & Humber, R. A.** A natural fungal infection of a sylvatic cockroach with *Metarhizium blattodeae* sp. nov., a member of the *M. flavoviride* species complex. *Fungal biology* 2016, 120(5), 655-665.



- **Onofre SB., Miniuk CM., Barros NM., Azevedo JL.** Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *Flavoviride* on culture media and lighting regimes. *Sci. agric.* 2001; 58(3): 613-616.
- **Oulevey, C., Widmer, F., Kölliker, R., & Enkerli, J.** An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. *Mycological Research* 2009; 113(9), 1016-1024.
- **Paracer, S., Ahmadjian, V.** *Symbiosis: an introduction to biological associations.* Oxford University Press; 2000.
- **Petrini, O.** Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* 1991; (pp. 179-197). Springer New York.
- **Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G., & Baverstock, J.** Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of invertebrate pathology* 2014. 119, 54-61.
- **Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J. A., Maranhao, E. A., Ortiz-Urquiza, A., & Santiago-Álvarez, C.** Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological research* 2007. 111(8), 947-966.
- **Rangel, D. E., Dettenmaier, S. J., Fernandes, E. K., Roberts, D. W.** Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. *Biocontrol Science and Technology* 2010; 20(4), 375-389.
- **Roberts DW, St Leger R. J.** *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Adv Appl Microbiol* 2004; 54: 1-70.
- **Roberts, D. W., Humber, R. A.** Entomogenous fungi. *Biology of conidial fungi* 1981; 2(201), e236.
- **Rudrappa, T., Czymbek, K. J., Paré, P. W., Bais, H. P.** Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology* 2008; 148(3), 1547-1556.
- **Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. D. S., de Oliveira, J., & Soccol, C. R.** New perspectives of gibberellic acid production: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 2012. 32(3), 263-273.
- **Sasan, R. K., Bidochka, M. J.** The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany* 2012; 99(1), 101-107.
- **Sasan, R. K., Bidochka, M. J.** Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. phaseoli. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2013; 35(3), 288-293.



- **Schulz, B., Boyle, C.** The endophytic continuum. *Mycological Research* 2005; 109(6), 661-686.
- **Shin, T. Y., Choi, J. B., Bae, S. M., Koo, H. N., Woo, S. D.** Study on selective media for isolation of entomopathogenic fungi. *International Journal of Industrial Entomology* 2010; 20(1), 7-12.
- **Spatafora, J. W., Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L. & White, J. F., Jr** Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Mol Ecol* 2007. 16, 1701–1711.
- **St Leger, R. J., Cooper, R. M., Charnley, A. K.** Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Microbiology* 1986; 132(6), 1509-1517.
- **St Leger, R. J., Durrands, P. K., Charnley, A. K., Cooper, R. M.** Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 1988; 52(2), 285-293.
- **St Leger, R. J., Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW.** Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(13):6349-54.
- **St Leger, R. J., Nelson, J. O., & Screen, S. E.** The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology* 1999.145(10), 2691-2699.
- **Steinbach, H. S., Benech-Arnold, R. L., & Sanchez, R. A.** Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. *Plant Physiology*, 1997, 113(1), 149-154.
- **Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J., Kristensen, H. L.** Root isolations of *Metarhizium* spp. from crops reflect diversity in the soil and indicate no plant specificity. *Journal of Invertebrate Pathology* 2015; 132, 142-148.
- **Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J., Thorup-Kristensen, K., & Meyling, N. V.** Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *Journal of invertebrate pathology* 2014, 123, 6-12.
- **Tao, G., Liu, Z. Y., Hyde, K. D., Lui, X. Z., & Yu, Z. N.** Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Divers* 2008. 33, 101-122.
- **Van der Putten, W.H.** "Plant-soil feedback and soil biodiversity affect the composition of plant communities", en R.D. Bargett, M.B. Usher y D.W Hopkins (eds.), *Biological diversity and function in soils*, Cambridge University Press; 2005.





- **Wang, C., Hu, G., & Leger, R. J. S.** Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology* 2005. 42(8), 704-718.
- **Wang, C., St Leger, R. J.** The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic cell* 2007; 6(5), 808-816.
- **Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. M. et al.** Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* 2012; 17(9), 10754-10773.
- **Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R. K., & Bidochka, M. J.** Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology* 2011. 157(10), 2904-2911.

CONFIDENCIAL