

**REPORTE PRELIMINAR DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Beauveria* spp. Y *Metarhizium* spp. PATOGENICOS AL CHAPULÍN GORDINFLÓN *Brachystola magna* Girard (ORTHOPTERA: ROMALEIDAE) EN CHIHUAHUA, MÉXICO**

Juan Carlos Bustillos-Rodríguez<sup>1</sup>, Claudio Rios-Velasco<sup>2</sup>, David Ignacio Berlanga-Reyes<sup>2</sup>, Carlos Horacio Acosta-Muñiz<sup>2</sup>, María Fernanda Ruiz-Cisneros<sup>1</sup>, Miguel Ángel Salas-Marina<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Estudiantes de posgrado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., <sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua, Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México. <sup>3</sup>Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Campus Irapuato Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México.

Correo: claudio.rios@ciad.mx

**RESUMEN.** El chapulín gordinflón *Brachystola magna* Girard (Orthoptera: Romaleidae), es la principal plaga del frijol *Phaseolus vulgaris* L. en México, principalmente en los estados de Zacatecas, Durango y Chihuahua. Su control depende de la aplicación de insecticidas químicos, sin embargo, dada su etología evasiva y de arribo constante al cultivo, se dificulta su manejo. Por lo que, el control microbial ha sido propuesto como una alternativa viable, efectiva y amigable con el ambiente, ya que dichos microorganismos se establecen en el área de cultivo, lo que permite que el insecto pueda ser infectado al momento de la aplicación del hongo o posteriormente mediante transmisión horizontal. El objetivo del estudio fue aislar e identificar molecularmente a hongos entomopatógenos patogénicos a *B. magna*. De las muestras suelo recolectadas, se obtuvieron 20 aislados de hongos, 17 correspondieron a *Metarhizium* spp. y tres a *Beauveria* spp.

**Palabras clave.** Control biológico, hongos entomopatógenos, insectos

**Preliminary report of molecular identification of *Beauveria* spp. and *Metarhizium* spp. pathogenic to lubber grasshopper *Brachystola magna* Girard (Orthoptera: Romaleidae) in Chihuahua, Mexico**

**ABSTRACT.** Lubber grasshopper *Brachystola magna* Girard (Orthoptera: Romaleidae), is the main insect pest of bean *Phaseolus vulgaris* L. in Mexico, mainly in the states of Zacatecas, Durango and Chihuahua. Its control depends on the application of chemical insecticides, however, given their evasive ethology and constant arrival to crops its management becomes difficult. The microbial control with entomopathogenic fungi has been proposed as a viable alternative, effective and friendly with the environment, since these microorganisms are established in the field, allowing the insect to be infected during the application of the fungi, or subsequently by horizontal transmission. The aim of the study was to isolate and identify molecularly entomopathogenic fungi pathogenic to *B. magna*. From the soil samples analyzed, were obtained 20 isolates of fungi, 17 corresponded to *Metarhizium* spp. and three to *Beauveria* spp.

**Keywords.** Biological control, entomopathogenic fungi, insects.

## INTRODUCCIÓN

El frijol se cultiva desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina (Aronson *et al.*, 1986; Berglund-Brücher y Brücher, 1976; Gentry, 1969). Las plagas que atacan al frijol se pueden clasificar, con base en el tipo de daño y la etapa de desarrollo fenológico de la planta atacada (Van Schoonhoven, 1982; Vega y Kaya, 2012). Los chapulines (Orthoptera: Acrididae;

Romaleidae) son cosmopolitas, distribuidos en zonas tropicales, desérticas o árticas, sin embargo, las altas poblaciones se desarrollan en las praderas semiáridas (Bland y Jaques, 2010), causando cuantiosas pérdidas en la agricultura, principalmente en cultivos de frijol y maíz. En los pastizales naturales se localiza principalmente a *Brachystola magna* Girard que se encuentra distribuido en las praderas occidentales de Estados Unidos y México, como un insecto polívoro, aunque su alimentación se basa en una gran variedad de herbáceas y pastos, tiene preferencia por las plantas de frijol, además de alimentarse de insectos (Jackman y Drees, 1998).

Las densidades de chapulines son más altas fuera del área de cultivo, por lo que, el tratamiento con insecticidas es necesario en las arvenses o área de pastizales que rodean a la parcela para prevenir la invasión (Capinera, 2008). Sin embargo, los efectos de los insecticidas sobre los organismos no objetivo, la contaminación de las aguas subterráneas, los residuos en los alimentos y el desarrollo de resistencia por parte de los insectos a los insecticidas usados, han conducido a la búsqueda de medidas alternativas de control (Shahid *et al.*, 2012). Una alternativa efectiva, viable y amigable con el medio ambiente para el manejo de *B. magna*, es el control biológico, particularmente mediante el uso de hongos entomopatógenos Hypocreales.

Los hongos entomopatógenos son generalmente identificados con base en sus características morfológicas macro y microscópicas (Vega *et al.*, 2009). Por lo que, el objetivo del estudio fue identificar molecularmente a aislados nativos de hongos entomopatógenos patogénicos a *Brachystola magna*.

## MATERIALES Y MÉTODO

Los hongos entomopatógenos fueron aislados a partir de suelos de diferentes cultivos mediante la técnica del insecto trampa, usando larvas del 3<sup>ro</sup>-4<sup>to</sup> estadio de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Zimmermann, 1986). Las larvas fueron obtenidas de una colonia mantenida bajo condiciones de laboratorio a  $25 \pm 2$  °C, con una humedad relativa  $\geq 70$  %. En cada muestra de suelo se colocaron 100 larvas en contenedores plásticos rectangulares y sellados e incubados por 7 d a 28 °C con  $90 \pm 5$ % de humedad relativa (HR). Las larvas micosadas fueron transferidas individualmente a cajas de Petri con una pieza de algodón humedecido y sellado con Parafilm, e incubadas a 28 °C en una cámara de crecimiento ambiental (Precisión Scientific, modelo 6LM). Los hongos entomopatógenos fueron purificados, mantenidos e incrementados en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) e identificados a nivel de género de acuerdo con sus características micro y macroscópicas, usando un microscopio Carl Zeiss (Barnett y Hunter, 1972).

Los aislados de hongos fueron identificados molecularmente, para lo cual se realizó la extracción del ADNr, usando un explante de micelio del hongo purificado, el cual fue colocado en cajas de Petri con agar-papa-dextrosa (PDA), e incubados a 26 °C por 7 d. El micelio se colocó en un mortero de porcelana y se añadió un amortiguador para la extracción de ADNr de hongos filamentosos a 70 °C (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS), estos fueron macerados siguiendo el protocolo descrito por Raeder y Broda (1985). El ADNr obtenido, fue examinado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, y posteriormente usado para amplificar el Espaciador Transcrito Interno (ITS) del 18S del ADNr usando los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde los fragmentos esperados fueron de aproximadamente 600 a 710 pb. Las condiciones de amplificación utilizadas consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 94 °C por 5

min, seguida por 30 ciclos que incluyeron una desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, una extensión a 72 °C por 45 s, para finalmente llevar una extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR, fueron examinados por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y purificados usando el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, California, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Estos productos fueron secuenciados por MacroGen (Maryland, USA) comparando las secuencias obtenidas contra la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), usando el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Posteriormente se realizó un dendrograma para observar las relaciones de agrupación de los entomopatógenos utilizando el programa MEGA 6 Versión 6.0.6.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras de suelo analizadas se obtuvieron 20 aislados de hongos entomopatógenos con diferencias en sus características morfológicas macro y microscópicas. De las cuales 17 correspondieron a *Metarhizium* spp. (13 pertenecieron a *M. anisopliae* (Metschnikoff), 2 a *M. robertsii* (Bischoff, Humber, y Rehner), 1 *M. pingshaense* (Q. T. Chen y H. L. Guo), y 3 a *Beauveria* spp. (2 *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin), de acuerdo con su caracterización molecular (Cuadro 1). *Beauveria bassiana* presentó células conidiógenas subglobosas y globosas con cuello corto, estructuras de los conidiógenos formando grandes grupos, conidias planas, globosas, elipsoidales y colonias blancas en PDA, tomando una coloración amarillenta en el anverso de la caja de Petri. Los aislados de *Metarhizium* spp. presentaron conidias compactadas en columnas, de coloración verde oliváceo. Las características morfológicas mostradas por los aislados fueron similares, sin embargo, se observaron diferencias genéticas, lo que da origen a una clasificación dentro de los mismos hongos (*Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp.), mostrando que los aislados Ma-C1, Ma-C3 y Ma-C4, están estrechamente relacionados genéticamente, compartiendo características similares a su ancestro común, mientras que los aislados Mg-C15, Mr-C16 y Ma-C17, se encuentran más alejados por lo que se sugiere que posiblemente han sufrido mutaciones genéticas que les pudieran conferir características relacionadas con su virulencia (Fig. 1). Estos resultados se asemejan a los encontrados por Bidochka *et al.* (1994), donde realizaron el aislamiento de hongos entomopatógenos procedentes de especies de insectos huésped similares, no obstante, encontraron variabilidad genética, incluso en hongos de la misma especie.

Los aislados tanto de *Metarhizium* spp. como de *Beauveria* spp. originaron bandas semejantes en cuanto a su peso molecular, encontrándose en un rango de 600 a 800 pb. Resultados similares fueron encontrados por Entz *et al.* (2005), al desarrollar un análisis de PCR para el hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* donde los productos amplificados se situaron en los 600 pb.

Cuadro 1. Identificación morfológica y molecular de cepas de hongos entomopatógenos obtenidos de suelos de cultivos usados en este estudio.

Código	Identificación morfológica	Identificación molecular	Banco de Genes*		
			Puntaje máximo	Identidad (%)	Número de acceso (Secuencia del ITS)
Ma-C1	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	1035	100	EU307900.1
Ma-C2	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	996	99	FJ545306.1
Ma-C3	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	996	99	EU307900.1
Ma-C4	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	989	99	FJ609312.1
Ma-C5	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	669	88	FJ545279.1
Ma-C6	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	994	99	FJ545306.1
Ma-C7	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	1027	99	FJ545302.1
Ma-C8	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	965	99	FJ545302.1
Ma-C9	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. pingshaense</i>	894	98	HQ331449.1
Ma-C10	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. robertsii</i>	933	99	KC355183.1
Ma-C11	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	732	92	KM371263.1
Ma-C12	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	928	99	FJ545306.1
Ma-C13	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	1048	99	FJ545302.1
Ma-C14	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	710	92	HQ539658.2
Ma-C15	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. quizhoense</i>	965	99	KF624796.1
Ma-C16	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. robertsii</i>	929	98	KC355183.1
Ma-C17	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>M. anisopliae</i>	994	99	FJ545306.1
Bb-C18	<i>Beauveria</i> sp.	<i>B. bassiana</i>	953	98	KC759730.1
Bb-C19	<i>Beauveria</i> sp.	<i>B. bassiana</i>	1044	99	KC753391.1
Bb-C20	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Beauveria</i> sp.	265	93	HQ022490.1

\*Los datos de secuenciación obtenidos de la base de datos del NCBI, mediante el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990), se compararon con las secuencias del GenBank, mostrando las cepas con mayor porcentaje de identidad y máximo puntaje con los aislados de este estudio.

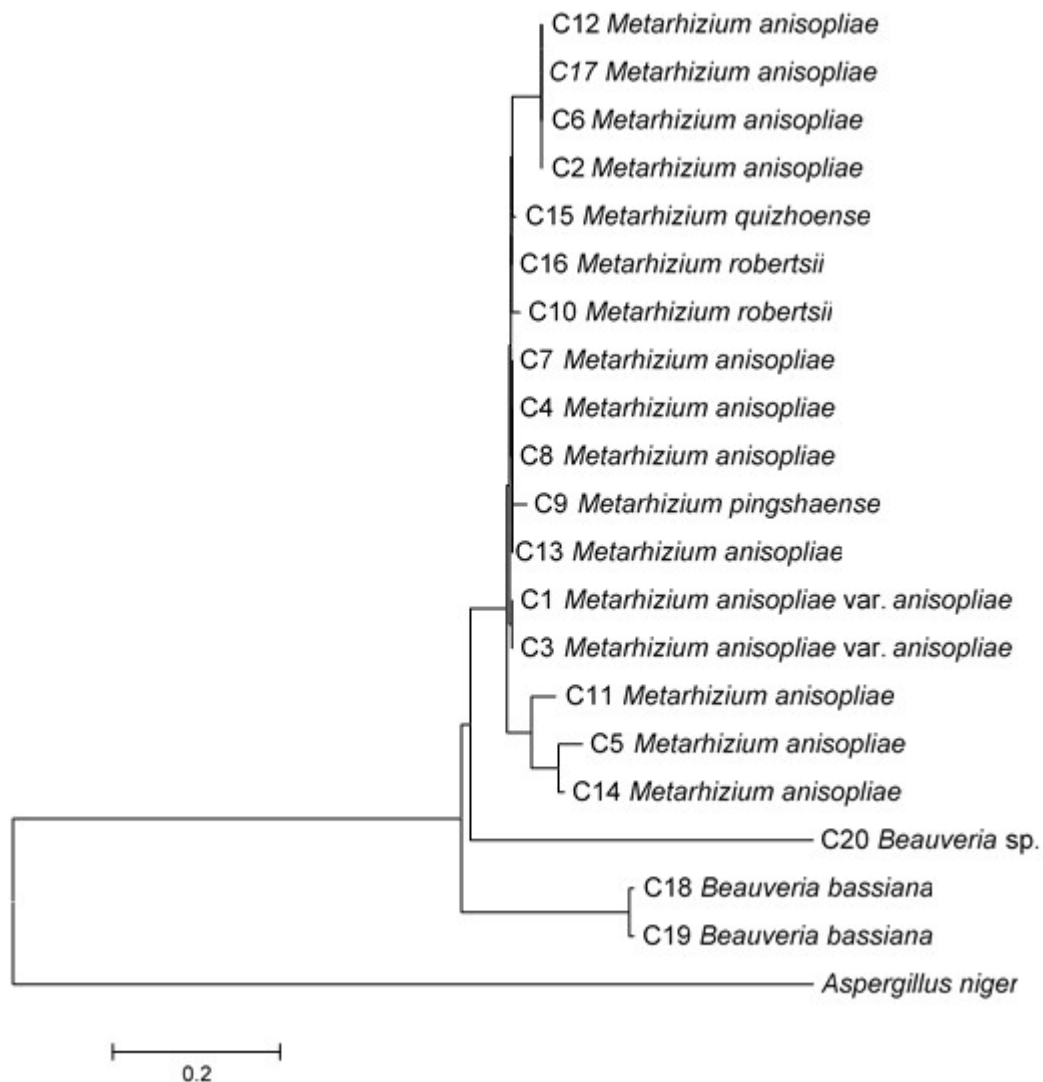


Figura 1. Dendrograma de los hongos entomopatógenos *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. patogénicos a *Brachystola magna*.

## CONCLUSIONES

La mayoría de los hongos entomopatógenos encontrados en este estudio pertenecen al género *Metarhizium*, siendo *M. anisopliae* el más representativo, lo que hace suponer, que presenta una amplia distribución en los diferentes agroecosistemas, en comparación con *Beauveria* spp., de igual manera, la variabilidad genética que presentaron los hongos entomopatógenos, les confiere diferente grado de patogenicidad y virulencia sobre insectos hospederos, por lo que, el estudio de dicha variabilidad es de suma importancia para la selección de candidatos para ser utilizados como agentes de control biológico dentro de programas de manejo integrado de plagas, en particular de *B. magna*.

## AGRADECIMIENTOS

A FUNDACIÓN PRODUCE CHIHUAHUA A.C., por el financiamiento del proyecto “Caracterización y manejo del chapulín gordinflón *Brachystola magna* Girard (Orthoptera: Romaleidae) en el cultivo del frijol, con énfasis en el control microbial, en el municipio de Cuauhtémoc, Chihuahua”, con número de registro 499.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Chihuahua (CESAVECH), en particular a la Junta Local de Sanidad Vegetal Papigochi y Las Chepas.

## LITERATURACITADA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Aronson, A. I., Beckman, W., & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews*, 50(1), 1-24.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*: Burgess.
- Berglund-Brücher, O., & Brücher, H. (1976). The south American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. *Economic Botany*, 30(3), 257-272.
- Bidochka, M., McDonald, M., Leger, R. S., & Roberts, D. (1994). Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*, 25(2), 107-113.
- Bland, R. G., & Jaques, H. E. (2010). *How to Know the Insects: Third Edition*: Waveland Press. 409.
- Capinera, J. L. (2008). *Encyclopedia of entomology*: Springer Science & Business Media.
- Entz, S. C., Johnson, D. L., & Kawchuk, L. M. (2005). Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Mycological Research*, 109(11), 1302-1312.
- Gentry, H. (1969). Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Economic Botany*, 23(1), 55-69.
- Jackman, J. A., & Drees, B. M. (1998). *A Field Guide to Common Texas Insects*: Taylor Trade Publishing.
- Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1), 17-20.
- Shahid, A. A., Rao, Q. A., Bakhsh, A., & Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 21-42.
- Van Schoonhoven, A. (1982). *Descripción y daños de las plagas que atacan el frijol*. Centro Internacional de Agricultura Tropical: CIAT.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., . . . Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149-159.
- Vega, F. E., & Kaya, H. K. (2012). *Insect pathology*: Academic Press. 512.
- Zimmermann, G. (1986). The ‘*Galleria* bait method’ for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102(1-5), 213-215.