

Variabilidad de cepas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en base a polimorfismos de ADN amplificadas al azar

Variability of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* based on the Random Amplified Polymorphic DNA technique

García-Pereyra J¹, GN Aviña-Martínez¹, AA Orozco-Flores², OG Alvarado-Gómez³, M García-Montelongo⁴, G Alexandre-Iturbide⁵, JN Uribe-Soto⁵, H Medrano-Roldan⁶

Resumen. Se analizó la variabilidad genética de tres cepas de un hongo entomopatógeno del género *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* denominadas MA22, MA24 y MA25 con la marca Spesifik®; dos cepas del producto Metasaven® clasificadas como MA1A y MAII; una cepa del producto Metatron®, y una cepa nativa denominada MACN. Ésta última fue aislada directamente del insecto chapulín (*Brachystola magna*) en las parcelas de los productores de maíz en Durango, región situada en el norte centro de México. Los estudios se realizaron en el laboratorio de biología molecular del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana de Durango, México, de septiembre de 2008 a junio de 2011. Se analizaron (1) la variabilidad genética entre las cepas mediante el empleo de la técnica RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) con una variante mediante el empleo de nueve oligonucleótidos diferentes para observar polimorfismos de ADN, (2) el índice de similitud entre las cepas y su relación filogenética, y (3) el porcentaje de mortandad en chapulín, *Brachystola magna*. El polimorfismo de las bandas amplificadas fluctuó entre 300 y 2000 pares de bases. El índice de similitud indicó que las cepas MAC25 y MAC24 presentaron el índice más alto. En el bioensayo, MACN presentó una mortandad de 62,5% y Metatron® de 37,5% sobre chapulín. Los testigos empleados fueron estadísticamente ($p > 0,05$) similares con una mortandad menor al 10%.

Palabras clave: Entomopatógenos; RAPD; *Metarhizium anisopliae*.

Abstract. It was analyzed the genetic variability of (1) three strains of a pathogenic fungi of the genus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, named MA22, MA24 and MA25, brand spesifik®; (2) two strains of the product Metasaven®, named MA1A and MAII; one strain of the product Metatron®, and a native strain named MACN. This latter strain was directly isolated from the insect chapulin (*Brachystola magna*), from the farmer, corn plots in Durango, located in north central Mexico. Studies were conducted in the laboratory of molecular biology of the Technological Institute of the Valley of Guadiana in Durango, Mexico, from September 2008 to June 2011. The (1) genetic variability among strains after using the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique using nine different oligonucleotides to observe DNA polymorphisms; (2) index of similarity among the strains and their phylogenetic relationship, and (3) percentage mortality of chapulin in a bioassay were determined. Polymorphism of the amplified bands varied between 300 and 2000 base pairs. The index of similarity was highest in the strains MAC25 and MAC24. In the bioassay, mortality of chapulin was 62.5% with MACN and 37.5% with Metatron®. Controls showed no significant differences ($p > 0.05$) among them, with a mortality lower than 10%.

Keywords: Entomopatógenos; RAPD; *Metarhizium anisopliae*.

¹ Profesor Investigador. Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, Apartado Postal 393. Durango, Dgo. México.

² Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. e-mail: lacxelo@gmail.com

³ Profesor Investigador de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, e-mail: omar-alvarado@prodigy.net.mx

⁴ Facultad de Ciencias Químicas UJED, Durango, e-mail: qfbmgm@gmail.com

⁵ Profesor Investigador del CIIIDIR-IPN Unidad Durango, e-mail: ghiturbide@hotmail.com

⁶ Profesor Investigador de la División de Estudios de Posgrado del Instituto Tecnológico de Durango, e-mail: hiramdurango@yahoo.com.mx

Address Correspondence to: Jesús García Pereyra, e-mail: jpereyra5@hotmail.com

Recibido / Received 2.VIII.2012. Aceptado / Accepted 22.X.2013.

INTRODUCCIÓN

Uno de los métodos empleado para el control de insectos plaga que atacan al cultivo de maíz, como el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith y el chapulín *Brachystola magna*, es con el uso de insecticidas químicos. En promedio se utilizan cuatro aplicaciones de medio litro cada una por hectárea, principalmente en la etapa de crecimiento vegetativo del cultivo. Esta es una práctica común efectuada por los productores de este grano en el Valle del Guadiana, Durango (García y Martínez, 2011). Este método de control de plagas ha traído consecuencias sobre el ambiente y la salud de los trabajadores agrícolas. Cada vez el control de estas plagas es más difícil, debido a que los insectos tienden a desarrollar resistencia a los insecticidas, situación provocada por el elevado número de aplicaciones (Zeno, 2006).

El uso de microorganismos principalmente a base de entomopatógenos para el control de insectos plaga es una alternativa viable para reducir las aplicaciones de los insecticidas químicos en forma escalonada en los campos de los productores de maíz. Sin embargo, su acción tóxica no se limita a este tipo de insectos, pudiendo afectar otros organismos que conviven en este ambiente productivo (Crecy et al., 2009). Actualmente en México, el uso de insecticidas biológicos es compatible con los esquemas de buenas prácticas agrícolas. Su uso contribuye a la sustentabilidad, lo que permite una producción de grano y de forraje más limpio, libre de residuos de plaguicidas químicos, que los mercados de productos alimenticios a nivel mundial están demandando. El empleo de dichos organismos para el combate de plagas se inició hace 50 años en México, pero se ha venido incrementando de forma significativa a partir de 1990 (Tamez et al., 2001). Los hongos entomopatógenos están asociados con insectos que habitan en diversos ambientes, incluyendo ecosistemas agrícolas, por lo cual han sido utilizados como agentes de control biológico como alternativa al uso de químicos. Estos hongos constituyen un grupo con más de 750 especies de casi 100 géneros que pueden infectar insectos, y la mayoría de ellos pertenecen a las divisiones *Zygomycota*, *Deuteromycota* y *Ascomycota* (Dávila y Castillo, 2001).

El *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* es un hongo ascomicota que tiene un amplio rango de insectos huéspedes, y cohabita con cerca de 200 especies de insectos que dañan a los cultivos agrícolas. Entre estas últimas se incluyen a las termitas, chapulines gallina ciega, langostas, picudos de chile y algodón, y escarabajos (Díaz et al., 2006). El mecanismo de parasitar al insecto consiste en una penetración directa en la cutícula, lo cual le permite multiplicarse en el hemocele. Una vez dentro del hospedero, consume los nutrientes y genera una micosis y posteriormente la muerte (Mnyone et al., 2009). La capacidad del microorganismo entomopatógeno para eliminar las plagas, llamada comúnmente virulencia, está determinada por la especie y las características genéticas del organismo (Dávila y Castillo, 2001). Muchas especies de hongos ento-

mopatógenos están compuestas por diversas cepas con amplia variabilidad genética, las que no siempre se pueden diferenciar por criterios morfológicos; se deben emplear técnicas moleculares para diferenciarlos de una manera más precisa (Guerrero et al., 2000b). Los análisis moleculares de ADN permiten detectar las variaciones entre los aislamientos, razas o prototipos diferentes (Dávila y Castillo, 2001). Principalmente se han usado cuatro tipos de marcadores moleculares para determinar la diversidad genética en hongos entomopatógenos: (1) los fragmentos de restricción polimórficos (RFLP), (2) el ADN polimórfico amplificado al Azar (RAPD), (3) las secuencias simples repetidas (SSR), y (4) los espaciadores internos transcritos (ITS); ITS 1 y 2. Todos estos marcadores han sido efectivos, lo cual ha permitido establecer variación y diferencias genéticas entre los hongos entomopatógenos (Becerra et al., 2007). Los objetivos de este proyecto fueron: (1) aislar una cepa nativa en chapulín *Brachistola magna* (denominada MACN) y producir micelio por fermentación en medio líquido, (2) caracterizar molecularmente a la cepa nativa MACN, y seis cepas comerciales de *Metarhizium anisopliae*, en base a polimorfismos de ADN amplificados al azar, (3) calcular el coeficiente de similitud entre las cepas, y (4) determinar la eficiencia en la mortandad de chapulín *Brachistola magna*, solo para el uso de dos cepas de *M. anisopliae*

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental consistió en: aislar la cepa nativa (denominada MACN) del hongo entomopatógeno, para lo cual se empleó la metodología propuesta por Guerrero et al. (2000b). Se colectaron chapulines adultos de distintas especies en los campos agrícolas del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana de Durango, México (24° 59' N, 104° 00' O, 1899 m.s.n.m.). Se mantuvieron vivos dentro de una cámara de cría en condiciones controladas de temperatura y humedad. Los chapulines muertos fueron extraídos de la cámara de cría y depositados en cajas de petri, con algodones humedecidos con agua destilada, y posteriormente se incubaron a 27 °C por 72 horas. En un vaso de precipitado se adicionaron 10 mL de agua destilada y se colocaron 5 g de chapulines muertos secos. La mezcla se homogeneizó durante cinco minutos. Se tomó 1,0 mL de la mezcla y se diluyó a una relación 1:200, se vertió un mililitro en una caja de petri con 39 g/L de PDA (agar dextrosa papa). De esta suspensión se tomó un mililitro y se hicieron tres diluciones distintas: 1:20 1:400, 1:8000, y en caja con PDA, dos siembras por estría. Éstas se incubaron a 28 °C durante 20 días. Las muestras positivas en la presencia del hongo entomopatógeno se inocularon en PDA inclinado en tubos de ensayo para su almacenamiento y refrigeración. Se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Para calcular la cantidad de esporas se utilizó la cámara de Neubauer®; se hicieron diluciones 1:100 y se colocó 0,1 mL dentro de la

cámara. Para calcular la cantidad de esporas se empleó la fórmula (Cantidad de esporas = células en la cámara x factor de dilución x factor de corrección). Las características microscópicas de los conidios de *M. anisopliae* se midieron con ayuda del software Motic Imagen Plus 2.0°.

Producción de micelio por fermentación en medio líquido. Para la fermentación en medio líquido (FMS) se realizó un diseño experimental de bloques al azar, para cuatro tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos fueron: (T1) caldo nutritivo compuesto: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,0 g; KH_2PO_4 3,5 g; MgSO_4 0,5 g; NaCl 0,1 g; CaCl_2 0,1 g; peptona de caseína 10,0 g; dextrosa 40,0 g; (T2) caldo Micológico 50,0 g por litro; (T3) caldo peptona de caseína-dextrosa: 40,0 g dextrosa, 10,0 g peptona de caseína; (T4) caldo Sabouraud-Dextrosa. Los diferentes tratamientos fueron inoculados con una azada de esporas de cada una de las siete cepas en matraces con un volumen de 100 mL. Estos fueron incubados durante cuatro días a 28 °C sin agitación para obtener el peso seco en gramos de biomasa por mililitro (g B/mL) de micelio; se filtró el contenido de cada matraz y se transfirió a un crisol con papel filtro, donde se secó durante 4 horas a 150 °C en una mufla. El peso seco y humedad se obtuvieron en base a las diferencias de peso de las muestras Húmeda y seca menos el peso del crisol. Se utilizó un $p \leq 0,05$ y la comparación de medias se efectuó por DMS (Olivares, 1996). La variable a estudiar fue el peso seco (en gramos de biomasa por mililitro) del micelio obtenido.

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN genómico se utilizó el método DNAzol®ES (2001), el cual consistió en utilizar 0,1 g de micelio que se colocó en un tubo de centrifuga nuevo y estéril de 1,5 mL. El material se (1) trituró con un pistilo de plástico estéril, (2) mezcló en un vortex, (3) adicionaron 0,6 mL del reactivo DNAzol®ES, (4) dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente, (5) agregaron 0,6 mL de cloroformo y (6) reposó por 5 min a temperatura ambiente. Las partículas solubles en agua incluyendo el ADN fueron separadas por centrifugación a 12000 g durante 10 min. El ADN de la fase acuosa obtenida fue precipitado mezclando por inversión con 0,75 Volúmenes de alcohol isoamílico, y almacenado a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, la muestra fue centrifugada a 5000 gravedades durante 4 minutos para precipitar el ADN. Después de este proceso se hizo un lavado con 0,6 mL de una solución de DNAzol- 0,75 volúmenes de Etanol. Posterior a una centrifugación a 5000 g por 4 min, se realizó un nuevo lavado con etanol al 80%, separando el pellet de ADN con centrifugación. Se removió el etanol por decantación y colocaron los tubos invertidos en posición vertical durante uno o dos minutos para secar la pastilla de ADN; ésta se disolvió en 25 a 100 μL de buffer TE (Tris 100 mM, EDTA 1 mM a pH de 8,0), y almacenó a -20 °C. Se empleó una variante en el método de extracción de ADN por el método de DNAzol® ES:

se emplearon (1) una enzima lítica comercial (con el objeto de romper la pared celular del hongo) junto con el reactivo DNAzol, incubando a 37 °C durante 30 minutos, y (2) RNAsa para eliminar las trazas de RNA.

Estimación de calidad y cantidad de ADN. La estimación de la calidad del ADN se efectuó en un espectrofotómetro Cary 50 VARIAN® en una dilución 1:100 (5,0 μL de ADN en 500 μL de buffer TE); las lecturas fueron tomadas a una absorbancia de 260 y 280 nanómetros (nm).

Amplificación de polimorfismos de ADN al azar. Se siguió la técnica de Dávila y Castillo (2001). En un tubo eppendorf de 500 μL se preparó el cóctel de PCR para todas las reacciones con los componentes de la Tabla 1. La cantidad por reacción fue de 23 μL , la cual se transfirió a tubos de PCR de 200 μL y se añadieron 2 μL de ADN genómico de las diferentes cepas, siendo 25 μL el total de cada reacción. La amplificación de polimorfismos al azar se realizó con 9 oligonucleótidos de 10 bases de longitud cada uno (F-01...F-10) (Tabla 2). La solución de PCR se basó en la metodología utilizada por Espinoza (2007): 2,5 μL de buffer 10x, 2 mM de MgCl, 0,4 mM de dNTPs, 0,4 ng de primer, una unidad de Taq polimerasa y agua grado MilliQ. La amplificación por PCR se realizó en un Termociclador Labnet® MULTI GENE II con un programa térmico descrito por Fegan et al. (1993). El mismo consistió en 94 °C 5 min, 30 ciclos de 94 °C 1 min, 37 °C 1 min y 70 °C 2 min, con una extensión final de 70 °C durante 10 min. Los productos amplificados por PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,5% preparado con buffer TBE 1X y teñido con 1 μL de bromuro de etidio 5 mg/mL, a un voltaje de 100 Voltios durante una hora. Posteriormente fueron observados bajo luz ultra violeta en un transiluminador, y fotografiados con una cámara fotográfica digital. Para saber el tamaño de cada una de las bandas amplificadas se utilizó un marcador de peso molecular Hyper Ladder™ I de 14 bandas de 200 pb a 10000 pb.

Determinación del coeficiente de similitud entre las cepas. La similitud entre las diferentes cepas de *M. anisopliae* se determinó a partir de matrices binarias de presencia-ausencia, basadas en las bandas de ADN amplificadas por la técnica RAPD. Las bandas generadas se tomaron como 1,0 y la ausencia de éstas se tomó como 0. La similitud filogenética (S_{ij}) se estimó mediante el índice de similitud de Dice (1945) usando la fórmula $[S_{ij}=2a/(2a+b+c)]$, donde a = bandas en común entre i y j, b = bandas presentes en i pero no en j, y c = bandas presentes en j pero no en i. Los índices de similitud entre todas las cepas fue calculado utilizando el software Paleontological Statistics versión 2.09 (2001), que permitió determinar un dendrograma (entre las cepas).

Bioensayos. Se efectuó un bioensayo en una cámara climática bajo ambiente controlado, con el objeto de conocer

el porcentaje de mortandad en chapulín *Brachystola magna*, empleando un diseño experimental de bloques al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. El primer tratamiento fue con el empleo de la cepa comercial Metatron®; el objetivo de emplear solo la cepa comercial Metatron® en el bioensayo fue por ser de fácil adquisición en el mercado, tener un precio accesible y haber sido empleada por otros autores en trabajos similares. En el segundo tratamiento se usó la cepa nativa MACN. En ambos tratamientos la dosis de bioinsecticida empleada fue de 1×10^6 conidias por mililitro. Se emplearon dos tratamientos más como testigo, uno empleando extracto de nopal y el otro usando agua destilada sin la aplicación de bioinsecticida. Se cuantificó el porcentaje de mortandad en chapulín *Brachystola magna*. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el paquete de cómputo de Olivares (1996) a una $p < 0,05$.

Tabla 1. Concentración de reactivos para la amplificación de polimorfismos de ADN al azar.

Table 1. Reagent concentration for the Random Amplified Polymorphic DNA technique.

Reactivo	Concentración Final	Cantidad por reacción
Buffer de PCR 5X	1X	5,0 μ L
MgCl ₂ 25 mM	2,0 mM	2,0 μ L
dNTP's (2,5 mM)	0,1 mM	3,0 μ L
Random-Primers	2,0 mM	1,0 μ L
Taq polimerasa (5u/ μ L)	1 unidad	0,1 μ L
Agua grado MiliQ		10,6 μ L

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos para RAPD utilizados.

Table 2. Oligonucleotide sequence for utilized RAPDs.

Oligonucleótido	Secuencia
F-01	5'-ACG GAT CCT G-3'
F-03	5'- CCT GAT CAC C -3'
F-04	5'-GGT GAT CAG G -3'
F-05	5'-CCG AAT TCC C -3'
F-06	5'-GGG AAT TCG G -3'
F-07	5'- CCG ATA TCC C-3'
F-08	5'-GGG ATA TCG G -3'
F-09	5'-CCA AGC TTC C -3'
F-10	5'-GGA AGC TTG G -3'

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conteo de UFC de los productos comerciales demostraron una viabilidad alta en los productos Metasaven® 1×10^8 , cepas MA1A y MACII con 1×10^7 ; y Metatron® 1×10^7 UFC. Las características fenotípicas de las cepas se muestran en la Tabla 3. El tamaño de las conidias confirmó que todas las cepas obtenidas fueron de la variedad *anisopliae*, con un margen de 3,5 a 9,0 μ m. El tamaño de las conidias así como el color verde-olivo de la especie concuerdan con la descripción efectuada por Guerrero et al. (2000b), siendo éstas de la variedad *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

Tabla 3. Características macro y microscópicas encontradas en las conidias de las cepas evaluadas.

Table 3. Macro and microscopic characteristics found in the conidia of the evaluated strains.

Cepa	UFC	Largo conidias (μ m)	Producto
MA1A	1×10^8	$3,4 \pm 0,3$	Metasaven®
MAII	2×10^4	$3,55 \pm 0,4$	Metasaven®
MA22	2×10^4	$4,0 \pm 0,5$	Spesifik®
MA24	1×10^6	$3,55 \pm 0,3$	Spesifik®
MA25	4×10^5	$3,5 \pm 0,3$	Spesifik®
Metatron	7×10^7	$3,5 \pm 0,3$	Metatron®
MACN	7×10^7	$4,1 \pm 0,8$	Cepa nativa

UFC: Unidades formadoras de colonias.

Producción de micelio por fermentación en medio líquido (FML). El ANVA del peso seco de los diferentes medios de cultivo líquido ($p < 0,05$) mostró que los cuatro tratamientos fueron estadísticamente diferentes siendo T3 (Peptona-Dextrosa) y T4 (caldo Sabouraud Dextrosa) los mejores tratamientos (Fig. 1).

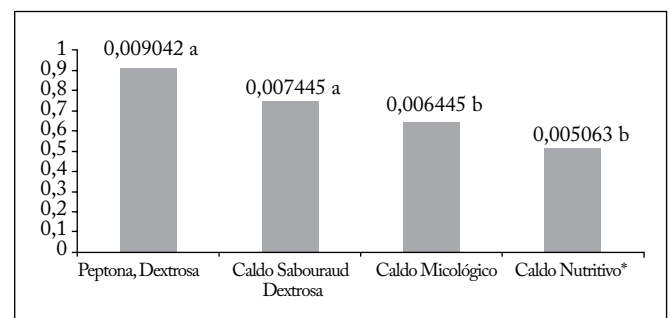


Fig. 1. Comparación de medias del peso seco por mililitro entre los diferentes tratamientos para FML para la producción de micelio. **Fig. 1.** Mean comparisons of the dry weight per milliliter among the different treatments for fermentation in liquid medium (FML) for the mycelium production.

Extracción de ADN. La mayoría de las cepas presentaron una fácil extracción de ADN por el Protocolo DNA-ZOL, adicionando enzima lítica y RNAsas. Los resultados de la calidad del ADN medido en el espectrofotómetro se aprecian en la Tabla 4. Aquí se muestra que el ADN es de buena calidad.

Amplificación de polimorfismos de ADN al azar. En la electroforesis en geles de agarosa al 1%, y medido de 100 a 2500 pares de bases (pb), el primer F-09 fue el que mostró mayor número de bandas (Fig. 2.) Teóricamente, 2000 pb es el mayor tamaño esperado, ya que la enzima Taq-polimerasa trabaja a 1000 pb por minuto y el tiempo de elongación empleado fue de 2 minutos. Guerrero et al. (2000a) reportaron amplificaciones de hasta 5000 pb, mientras que Dávila y Castillo (2001) solo alcanzaron los 1500 pb con marcadores moleculares similares a los utilizados en este estudio.

Coefficiente de similitud entre las cepas. Las siete cepas evaluadas fueron todas diferentes; las cepas MA24 y MA25, correspondientes a la cepa del producto comercial Spesifik®, mostraron mayor similitud filogenética con un índice de similitud del 0,847, siendo 1,0 una similitud total (Tabla 5). Las cepas que presentaron una similitud menor con respecto a la cepa nativa MACN fueron la MA1A (con un índice de 0,576), seguida de las cepas MA24 (índice=0,603 y MA25 (índice=0,615). Las cepas comerciales empleadas en este estudio, así como la cepa MACN, tuvieron mayor similitud que las obtenidas por Guerrero et al. (2000a) donde encontró una similitud de 0,42 a 0,51.

En el dendograma de similitud filogenética se aprecia un grupo de gran similitud conformado por las cepas MA24, MA25, Metatron® y la Cepa Nativa. Las cepas MA24 y MA25 del producto Spesifik® fueron las más similares; de igual manera, las cepas Metatron® y MACN mostraron gran similitud (Fig. 3). Nuestros resultados son similares a lo informado por Fegan et al. (1993) en donde el alto grado de diversidad ge-

Tabla 4. Concentración de ADN obtenida en las extracciones de las siete cepas de *M. anisopliae*.

Table 4. DNA concentration in the extractions from the seven strains of *M. anisopliae*.

Cepa	ADN µg/mL	Proteínas µg/mL	Absorbancia 260/280 nm*
Metatron	22,3133	-1,0667	2,0116
MACII	115,2100	-159,5867	2,2002
MA1A	13,5200	-285,5367	1,9635
MA25	7,4467	-182,3900	1,8245
MA24	43,0333	32,2967	1,4107
MA22	1,4867	16,9900	1,2923
MACN	47,8200	-140,3200	1,9561

nética de *M. anisopliae* var. *anisopliae* determinado por análisis RAPD se relacionó con la localización geográfica. Guerrero et al. (2000a) constataron mediante el análisis RAPD que las cepas evaluadas presentaban alto nivel de polimorfismo entre las cepas de *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Hajek y Leger (1994) señalaron que el aislamiento geográfico y la limitada capacidad de dispersión de las esporas, especialmente para *M. anisopliae*, pueden ser importantes en la evolución de los diferentes genotipos. Ellos analizaron diversos aspectos que explican la alta variabilidad genética intraespecífica que se observó entre aislados de *Metarhizium anisopliae*.

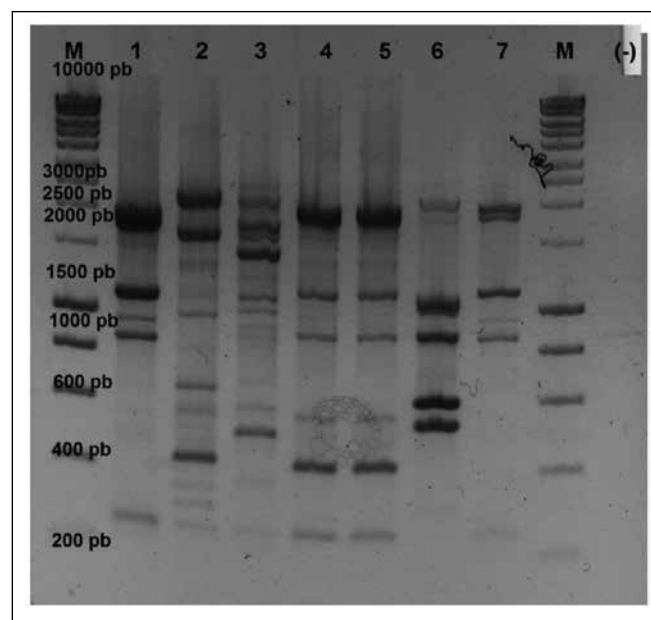


Fig. 2. Amplificación de Polimorfismos de ADN al azar empleando el primer F-09 en gel de agarosa al 1%. Carril (1) Metatron®, (2) MACII, (3) MA1A, (4) MA25, (5) MA24, (6) MA22, (7) MACN, (-) control negativo, como marcador se utilizó Hyper Ladder™ I de 14 bandas de 200 pb a 10000 pb.

Fig. 2. Use of the Random Amplified Polymorphic DNA technique using the first F-09 in agarose gel at 1%. Columns are for (1) Metatron®, (2) MACII, (3) MA1A, (4) MA25, (5) MA24, (6) MA22, (7) MACN, (-) negative control. Hyper Ladder™ I was used as marker of 14 bands from 200 to 10000 base pairs.

Bioensayo. Los cuatro tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$; Fig. 4). T1 (solo con extracto de nopal) y T2 (a base de agua destilada) fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$), con una mortandad de chapulines menor al 10%; T3 (Metatron®) presentó una mortandad del 37,5%, y T4 (MACN) mostró una mortandad del 62,5% en chapulín. La cepa nativa mostró un índice de mortalidad superior a la cepa de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* denominada DL₅₀ reportada por Zeno (2006), mientras que el producto Metatron® estuvo un 50% menor que la misma cepa DL₅₀.

Tabla 5. Índice de similitud de las bandas generadas por la amplificación de polimorfismos al azar de las siete cepas de *M. anisopliae* evaluadas.

Table 5. Similarity index of the bands generated using Random Amplified Polymorphic DNA technique from the seven evaluated strains of *M. anisopliae*.

	Metatron	MACII	MA1A	MA25	MA24	MA22	Cepa Nativa
Metatron	1	0,67647	0,70588	0,72131	0,80645	0,63158	0,76364
MACII	0,67647	1	0,63889	0,64615	0,63636	0,62295	0,67797
MA1A	0,70588	0,63889	1	0,64615	0,63636	0,59016	0,57627
MA25	0,72131	0,64615	0,64615	1	0,84746	0,59259	0,61538
MA24	0,80645	0,63636	0,63636	0,84746	1	0,58182	0,60377
MA22	0,63158	0,62295	0,59016	0,59259	0,58182	1	0,66667
MACN	0,76364	0,67797	0,57627	0,61538	0,60377	0,66667	1

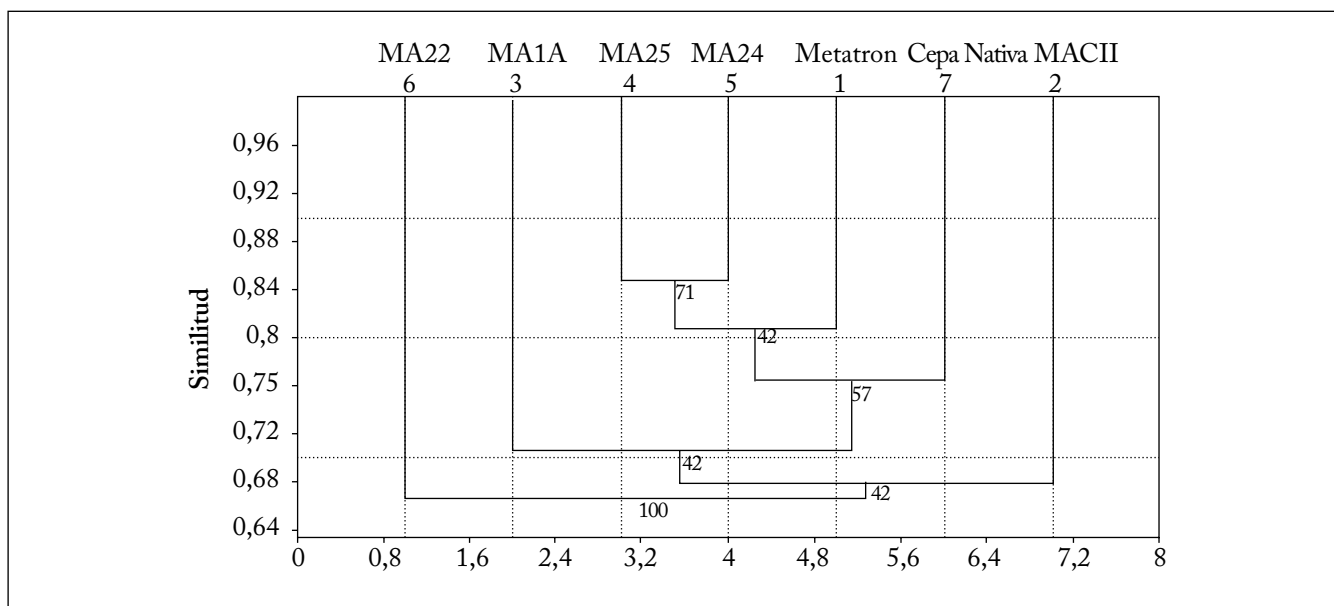


Fig. 3. Dendrograma de similitud filogenética en la evaluación de las siete cepas de *M. anisopliae*.

Fig. 3. Dendrogram of phylogenetic similarity in the evaluation of seven strains of *M. anisopliae*.

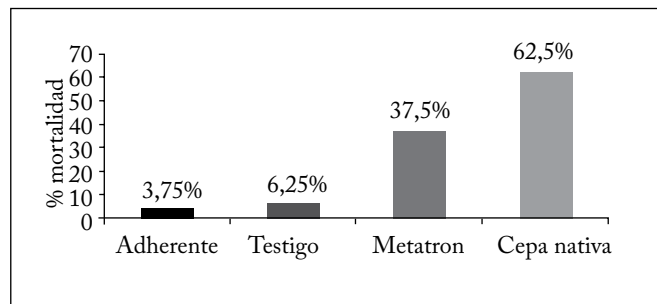


Fig. 4. Promedio de mortandad de chapulín *Brachistola magna* expuestas a extracto de nopal como adherente, un testigo solo con agua destilada aplicada, con Metatron® y con la cepa nativa MACN.

Fig. 4. Mean mortality of chapulin, *Brachistola magna*, exposed to (1) extract of nopal as adherent, (2) distilled water (control), (3) a strain of the product Metatron®, and (4) the native strain MACN.

CONCLUSIONES

De acuerdo al tamaño de las conidias, todas las cepas comerciales evaluadas junto a la cepa nativa fueron de la especie *M. anisopliae* var. *anisopliae*. El oligonucleótido F-09 amplificó mayor número de polimorfismos de ADN al azar en las cepas de *M. anisopliae*. Las siete cepas de *M. anisopliae* evaluadas fueron todas diferentes, y presentaron un índice de similitud mayor que otras cepas reportadas por diversos autores. La cepa aislada del producto comercial Metatron® mostró el índice de similitud más alto con respecto a la cepa nativa, aislada en los campos de los productores de maíz del Valle del Guadiana en Durango. Los resultados en los bioensayos fueron de mayor relevancia para las cepas de *M. anisopliae* Metatron® y MACN, siendo ésta última la de mayor respuesta en la mortandad de *Brachistola magna* bajo ambiente controlado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen al Tecnológico Nacional de México, por el financiamiento otorgado por la beca de alumnos integrados a proyectos de investigación. Al Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana de Durango y al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango por los apoyos económicos recibidos. A la Fundación PRODUCE A. C. de Durango, por los apoyos económicos para la transferencia de tecnología con productores de maíz en Durango. G. Alejandro Iturbide agradece a la COFAA del IPN por la beca de exclusividad.

REFERENCIAS

- Becerra, V., M. Paredes, C. Rojo y I. France (2007). RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. *Agric. Técnica (Chile)* 67: 115-125.
- Crecy, E., S. Jaronski, B. Lyons, T. Lyons y N. Keyhani (2009). Directed evolution of a filamentous fungus for thermotolerance. *BMC Biotechnology* 9: 74-77.
- Dávila, M. y M. Castillo (2001). Uso de la técnica RAPD para la Identificación de fragmentos de ADN posiblemente relacionados con virulencia en hongos entomopatógenos. *Bioagro* 13: 93-98.
- Díaz, M., M. Flores, S. Rodríguez y M. de la Torre (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31: 856-860.
- Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- DNAzol®ES (2001). Molecular Research Center. Manufacturer Protocol.
- García, P.J. y G.N.A. Martínez (2011). Transferencia de tecnología en el uso de entomopatógenos para el control de plagas en maíz. *Fundación Produce Durango A. C.* 2: 2-28.
- Guerrero, J., R. Carrillo y A. Aguilera (2000a). Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, asociado a larvas de escarabaeidos y curculionidos. *Agrosur* 27: 23-34.
- Guerrero, J., M. Mera, G. Salvo y R. Carrillo (2000b). Discriminación de cepas nativas Chilenas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* con Marcadores Moleculares RAPD. *Agrosur* 28: 81-91.
- Hajek, A. y R. Leger (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
- Mnyone, L., M. Kirby, D. Lwetoijera, M. Mpingwa, B. Knols, W. Takken y T. Russell (2009). Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal* 8: 309.
- Olivares, S.E. (1996). Paquete de Diseños Experimentales. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, versión 2.5.
- PAST (2001). Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Versión 2.09.
- Tamez, G.P., L. Galan, H. Meldrano, C. García, C. Rodríguez y R. Gómez (2001). Bioinsecticidas: Su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL* 6: 143-152.
- Zeno, S.C. (2006). Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en el Petén, Guatemala. Tesis Doctoral CATIE.