



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Evaluación de la producción y calidad de hongos
entomopatógenos aislados de 5 Delegaciones agrícolas
del Distrito Federal.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A

ANSELMO ESTEFES CHÁVEZ

BIÓLOGO EXPERIMENTAL

DIRECTOR: Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESOR: Dr. JOSÉ FRANCISCO MIRANDA HERNÁNDEZ

JULIO 2015

México, D.F. a 14 de Julio de 2015

El jurado designado por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Evaluación de la producción y calidad de hongos entomopatógenos aislados de 5 Delegaciones agrícolas del Distrito Federal

que presentó:

Anselmo Estefes Chávez

Comité Tutorial


Director: Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. José Francisco Miranda Hernández Universidad Autónoma Metropolitana

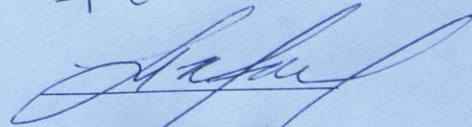
Lector: M. en B. Rafael Alejandro Ángel Cuapio, Universidad Autónoma Metropolitana

Jurado:

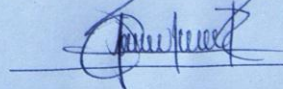
Presidente: Dr. Octavio Loera Corral



Secretario: Dr. José Francisco Miranda Hernández



Lector: M. en B. Rafael Alejandro Ángel Cuapio



Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación (SECIT) del Distrito Federal por la beca otorgada durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Octavio Loera por invitarme a trabajar en su fascinante e interesante proyecto, creer en mí para desarrollar este trabajo y la formación académica otorgada a mí persona.

Un agradecimiento muy en especial a la Dra. Raquel Alatorre Rosas, quien con los conocimientos y formación que me otorgó, me sumergirme en el interesantísimo mundo del control biológico y cuyos enseñanzas compartidos son y fueron el pilar para el desarrollo de este trabajo. Además, por ese interés siempre demostrado en el avance durante el desarrollo de mí trabajo.

Al Dr. Francisco Miranda, asesor de mi trabajo. A quien agradezco todos los excelentes comentarios, sugerencias, aportaciones e interesantes pláticas sobre el tema de la tesis (y pláticas extra tesis), mismas que la dieron forma, enriquecieron e hicieron que tuviera un mejor final.

A Josué, Miguel y Berenice por brindarme su amistad y compartir buenas pláticas, haciendo más agradable mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Viniegra, por todas las excelentes críticas constructivas y todos esos comentarios que, no solo ayudan en la vida profesional, sino también en la vida personal.

Resumen.

El control biológico, definido como el uso de enemigos naturales de las plagas agrícolas, incluyen una gran variedad de grupos taxonómicos: ácaros, nematodos y microorganismos; dentro del grupo de los microorganismos se encuentran las bacterias, los virus, y hongos entomopatógenos. Los hongos entomopatógenos son es una herramienta implementada desde finales del siglo XIX en el combate a las plagas. Con el surgimiento de la “revolución verde” en la década de los años 40 del siglo XX, se dio una sobreproducción agrícola con el uso de plaguicidas, fungicidas y herbicidas de origen sintético, frenando en desarrollo del control biológico. El uso desmedido de los plaguicidas de origen sintético, ocasionó resistencia de las plagas a ellos, surgimiento de nuevas plagas, daño a los agroecosistemas, a la salud de los agricultores y los consumidores. Por sus efectos adversos a la salud y al medio ambiente, partir de la década de los años setenta del siglo pasado, la legislación mundial en materia ambiental comenzó a prohibir el uso de algunos plaguicidas altamente tóxicos. En esos años, nuevamente recobra interés el uso de los enemigos naturales de las plagas y entre ellos, los hongos entomopatógenos. Los géneros de hongos entomopatógenos aislados de suelo con mayor destrucción a nivel mundial son: *Metarhizium* y *Beauveria*. El desarrollo biotecnológico que se ha logrado a nivel mundial en hongos entomopatógenos, ha permitido el control de algunas plagas agrícolas con el diseño de bioplaguicidas con base en uso de los conidios o micelio de estos hongos, a partir de cepas silvestres.

Contar con una colección propia de cepas endémicas, permite dar inicio a pruebas de control en laboratorio y campo, de plagas de importancia económica en las zonas agrícolas del Distrito Federal. Para su uso en futuros programas de control biológico, ya que, ofrecen grandes beneficios a los agroecosistemas. Además, la ventaja de contar con este tipo de colección es que permite tener un germoplasma propio, adaptado a las condiciones climáticas del Distrito Federal.

En este trabajo se aislaron 26 cepas de hongos entomopatógenos; una de insecto, identificada como *Beauveria bassiana* y 25 pertenecientes al género *Metarhizium*, de los cuales 9 cepas son de *Metarhizium anisopliae*, una es de *Metarhizium robertsii* y 15 de *Metarhizium* sp. Muestras de todas las cepas fueron depositadas en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Siete cepas fueron preservadas por dos métodos: 1) criopreservación a -80° C durante 5 meses y 2) en agua estéril a 4° C; el mejor método de preservación fue en agua estéril a 4° C y la mejor cepa fue *Metarhizium robertsii* Xoch-6.1. Se seleccionaron las cepas *Beauveria bassiana* Tac-1, *Metarhizium* sp. Cuj-2.1, *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 y *Metarhizium* sp. Xoch-8.1 para comparar los parámetros de: producción de conidios en arroz (con/gssi), germinación (%), germinación en condiciones hiperosmolaridad (%) (estrés osmótico), termotolerancia a 45° C (TS₅₀) y realizar

Bioensayos con los conidios cultivados en arroz (% de mortalidad) con larvas de *Tenebrio molitor*, contra la cepa comercial metasin® de *Metarhizium anisopliae* ABNMa201. El aislado *Beauveria bassiana* Tac-1, fue quien produjo más conidios (2.17×10^{10} con/gssi), es una cepa completamente diferente a *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 metasin® que, produjo 2.03×10^9 con/gssi. Sin embargo, la producción de conidios de las cepas silvestres registraron órdenes de magnitud que la cepa comercial. La cepa con mayor porcentaje de germinación fue el preparado comercial *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 (88.85%). En condiciones de estrés osmótico el mejor aislado fue *Metarhizium* sp Cuj-2.1 con 64.50 y 96.59% de viabilidad. La cepa más termotolerante fue *Beauveria bassiana* Tac-1. Sin embargo la cepas que causo mayor porcentaje de muerte (42 y 54) fue *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1, lo que nos muestra en este trabajo que, no se pudo establecer una relación entre la germinación y la infectividad en ninguna de las cepas estudiadas.

Índice general.

1. Introducción.....	11
1.1. Zona geográfica de colecta de hongos entomopatógenos: Distrito Federal.....	11
1.2. Producción agrícola del D. F.....	13
1.3. Principales plagas que atacan a los cultivos agrícolas del D.F.....	13
1.3.1. Plagas de maíz.....	13
1.3.2. Plagas de Nopal.....	14
1.3.3. Plagas de Amaranto.....	15
1.3.4. Plaguicidas empleados para su control.....	15
1.4. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.....	15
1.5. Manejo integrado de plagas (MIP).....	17
1.6. Hongos entomopatógenos (HE).....	17
1.7. Proceso infectivo de HE.....	18
1.7.1 Adhesión y germinación de la espora.....	18
1.7.2. Colonización del hemocele.....	19
1.7.3. Muerte del insecto (reproducción).....	19
1.8 Pros y Contras en el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico.....	19
1.8.1. Atributos e impacto en el uso de los hongos entomopatógenos.....	19
1.8.2. Desventajas en el uso de los hongos entomopatógenos.....	20
1.9. El suelo.....	20
1.9.1. Factores que afectan el suelo.....	21
1.10. Diversidad y distribución de los hongos entomopatógenos.....	22
1.11. Colecta de muestras de suelo e insectos.....	23
1.12. Aislamiento de hongos entomopatógenos.....	24
1.12.1. Aislamiento de suelo, utilizando el insecto trampa.....	24
1.12.2. Aislamiento de suelo, utilizando medios selectivos.....	25
1.12.3. Aislamiento a partir de insectos con o sin micosis.....	25
1.13. Identificación de los asimientos.....	26
1.13.1. Identificación morfológica.....	26
1.13.2. Identificación molecular.....	26
1.14. Desarrollo de bioplaguicidas.....	27
1.14.1 Producción masiva.....	27
1.14.2. Pruebas de calidad.....	28
1.14.2.1. Germinación.....	28

1.14.2.2. Germinación en condiciones de hiperosmolaridad (Estrés osmótico).....	29
1.14.2.3. Termotolerancia.....	29
1.15. Preservación.....	30
1.16. Productos comerciales elaborados con base en hongos entomopatógenos.....	30
2. Antecedentes.....	31
3. Justificación.....	32
4. Hipótesis.....	32
5. Objetivos.....	32
5.1. General.....	32
5.2. Particulares.....	33
6. Materiales y métodos.....	33
6.1. Desarrollo de la clave de los aislados.....	33
6.1.1. Clave para aislamientos plurispóricos.....	34
6.1.2. Clave para aislamientos monospóricos.....	34
6.2. Colecta de suelo e insectos.....	34
6.3. Aislamiento de HE (obtención de aislados plurispóricos).....	45
6.3.1. Aislamiento por el método de trapeo.....	45
6.3.2. Aislamiento por el método de alícuota.....	47
6.3.3. Aislamiento a partir de insectos colectados.....	47
6.4. Cultivo monospórico.....	48
6.5. Identificación morfológica.....	48
6.6. Identificación molecular.....	49
6.6.1. Obtención del micelio fúngico.....	49
6.6.2. Extracción del ADN.....	50
6.6.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	51
6.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
6.6.5. Electroforesis de PCR en gel de agarosa.....	51
6.6.6. Purificación, secuenciación e identificación de los aislados.....	51
6.7. Preservación de los aislamientos.....	52
6.8. Envío de muestras al Centro Nacional de referencia de Control Biológico (CNRCB).....	53
6.9. Producción de conidios en sustrato sólido (arroz).....	54
6.9.1. Preparación del inóculo.....	54
6.9.2. Producción de conidios en arroz.....	54
6.10. Pruebas de calidad.....	55
6.10.1. Germinación.....	55

6.10.2. Germinación en condiciones de hiperosmoralidad (Estrés osmótico).....	56
6.10.3. Termotolerancia.....	56
6.10.4. Bioensayo.....	57
6.11. Caracterización del suelo.....	58
6.12. Análisis estadístico.....	58
7. Resultados y discusión.....	58
7.1. Aislamiento de Hongos entomopatógenos de suelo e insectos.....	58
7.2. Cultivo monospórico.....	62
7.3. Identificación morfológica.....	62
7.4. Identificación molecular.....	63
7.5. Preservación de cepas.....	66
7.6. Envío de muestras al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.....	69
7.7. Producción de conidios.....	70
7.8. Pruebas de calidad.....	73
7.8.1. Germinación.....	73
7.8.2. Germinación en condiciones de hiperosmoralidad (Estrés osmótico).....	76
7.8.3. Termotolerancia.....	79
7.8.4. Bioensayo.....	80
8. Conclusiones.....	82
9. Perspectivas.....	83
10. Bibliografía.....	84
Anexos.....	96
Anexo A. Aislados plurispóricos obtenidos de cinco delegaciones rurales del D.F.....	96
Anexo B. Aislados monospóricos obtenidos de los aislados plurispóricos (purificación).....	98
Anexo C. Estructuras reproductoras de los aislados monospóricos. (Identificación morfológica)..	100
Anexo D. Secuencias amplificadas de los aislados monospóricos.....	106
Anexo E. Resultados de la Identificación molecular de los aislados.....	130
Anexo F. Certificado de depósito de las cepas en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.....	139

Índice de figuras.

Figura 1.1. Distribución de climas en el Distrito Federal. Tomado de INEGI (2002).....	11
Figura 1.2. Daño a la salud y ambiente con plaguicidas de origen sintético.....	15
Figura 1.3. Multiplicación del hongo entomopatógeno en un hospedante.....	19
Figura 1.4. Estructuras reproductoras de un hongo entomopatógeno.....	26
Figura 1.5. Germinación a las 15 h de conidios de un hongo entomopatógeno del género <i>Metarhizium</i>	29
Figura 6.1. Los 7 puntos muestreados del D.F.....	35
Figura 6.2. Ejemplo de la forma colectada en 6 delegaciones.....	43
Figura 6.3. Muestras de suelo e insectos colectados y etiquetados.....	43
Figura 6.4. Colecta de suelo e insectos en las 7 Delegaciones Rurales del D.F.....	44
Figura 6.5. Proceso del trapeo para obtener los aislamientos plurispóricos (pasos del 1 al 12)...	46
Figura 6.6. Aislamiento de HE a partir de insecto.....	47
Figura 6.7. Proceso de obtención del cultivo monospórico.....	48
Figura 6.8. Montajes y equipo de microscopia para realizar la identificación morfológica.....	49
Figura 6.9. Obtención del micelio fúngico de los aislados para su identificación.....	50
Figura 6.10. Extracción del AND con el kit de Promega de purificación comercial Wizard®.....	50
Figura 6.11. Conservación de 7 cepas aisladas del D.F.....	53
Figura 6.12. Muestras de las cepas aisladas para su envío y depósito en el CNRCB.....	53
Figura 6.13. Inóculo de 7 días de cultivo para resiembra en arroz.....	54
Figura 6.14. Cultivo de las 4 cepas aisladas en arroz y la cepa comercial ABNMa201.....	55
Figura 6.15. Germinación de conidios de aislados del género <i>Metarhizium</i>	55
Figura 6.16. Realización del bioensayo con los conidios cultivados en arroz de las 4 cepas aisladas y la cepa comercial ABNMa201.....	57
Figura 7.1. Gel de electroforesis de los productos de PCR de los aislados <i>Metarhizium</i> sp Mag-1.1, <i>Metarhizium</i> sp Xoch-1.1, <i>Metarhizium</i> sp Cuj-1.1, <i>Metarhizium anisopliae</i> Xoch-2.1 y <i>Metarhizium</i> sp Xoch-3.1. El control positivo (CP) utilizado fue <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotae</i> CP-Oax. El control negativo (CN) es la mezcla de la reacción de PCR sin muestra de ADN fúngico y marcador de peso molecular (MPM), es el valor de referencia de peso molecular.....	64

Figura 7.2. Viabilidad de 7 cepas de <i>Metarhizium</i> conservadas en agua estéril a 4° C. Se muestra la viabilidad encontrada durante los 5 meses de conservación.....	67
Figura 7.3. Viabilidad de 7 cepas de <i>Metarhizium</i> conservadas por el método de criopreservación (-80°C). Se muestra la viabilidad encontrada durante los 5 meses de conservación.....	68
Figura 7.4. Producción de conidios de tres aislados del género <i>Metarhizium</i> (experimento uno)....	70
Figura 7.5. Producción de conidios de tres aislados del género <i>Metarhizium</i> y la cepa de <i>M. anisopliae</i> ABNMa201.....	71
Figura 7.6. Producción de conidio a los 10 días de la cepa de <i>Beauveria bassiana</i> Tac-1.....	71
Figura 7.7. Porcentaje de germinación de las 4 cepas del primer experimento (15h).....	75
Figura 7.8. Germinación de las 4 cepas y una comercial del segundo experimento (12h).....	75
Figura 7.9. Porcentaje de viabilidad de los conidios en condiciones de estrés osmótico de las 4 cepas aisladas (primer experimento).....	78
Figura 7.10. Porcentaje de viabilidad de los conidios en condiciones de estrés osmótico de las 4 cepas aisladas y la cepa comercial <i>Metarhizium anisopliae</i> ABNMa201.....	78
Figura 7.11. Primera prueba de infectividad de cuatro cepas de hongos entomopatógenos hacia larvas del insecto <i>Tenebrio molitor</i>	81
Figura 7.12. Segunda prueba de infectividad de cuatro cepas de hongos entomopatógenos y la cepa comercial <i>M. anisopliae</i> ABNMa201 hacia larvas del insecto <i>Tenebrio molitor</i>	81

Índice de tablas.

Tabla 1.1. Productos agrícolas del D.F.....	13
Tabla 1.2. Plagas de importancia económica en maíz.....	14
Tabla 6.1. Claves asignadas a cada Delegación.....	33
Tabla 6.2. Ejemplo de un nombre hipotético para un aislamiento plurispórico.....	34
Tabla 6.3. Ejemplo de un nombre hipotético para un aislamiento monospórico.....	34
Tabla 6.4. Muestreo y Georreferenciación de los 7 recorridos realizados en las delegaciones rurales del D.F. El sistema UTM (Universal Transversa de Mercator) es una referencia Internacional que nos permite ubicar geográficamente un objeto en la Tierra y así conocer su latitud y longitud, la cual está dada en metros. El numero 14 indica a que región de la República Mexicana pertenece esa coordenada relacionado con el Huso. La letra Q está relacionada con la Latitud.....	36
Tabla 7.1. Localización geográfica y política de las zonas elegidas para el aislamiento de hongos entomopatógenos. Se muestra también el tipo de cultivo de cada campo agrícola y forestal del D.F.....	58
Tabla 7.2. Clasificación de las clases texturales de suelo (de la Federación, D. O. 2002).....	60
Tabla 7.3. Valores de referencia para clasificar la concentración de materia orgánica en suelos...60	60
Tabla 7.4. Propiedades físicas y químicas del suelo a partir de donde se obtuvieron los HE.....	61
Tabla 7.5. La identificación se realizó tanto con métodos morfológicos como de biología molecular de los 26 aislados.....	65
Tabla 7.6. Porcentaje de viabilidad de 7 aislados del género <i>Metarhizium</i> en dos métodos de conservación. La prueba se realizó transcurridos 5 meses.....	66
Tabla 7.7. Producción de conidios de 4 aislados y la cepa de <i>M. anisopliae</i> ABNMa201.....	70
Tabla 7.8. Porcentaje de germinación (12 y 15 h) de las cepas evaluadas y la cepa comercial ABNMa201.....	73
Tabla 7.9. Porcentaje de viabilidad de los conidios de 5 cepas de hongos entomopatógenos.....	77
Tabla 7.10. Termotolerancia de los conidios de 4 aislados ajustados al modelo de decaimiento exponencial.....	79
Tabla 7.11. Porcentaje de muerte de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> con 4 aislados y la cepa comercial <i>M. anisopliae</i> ABNMa201.....	80

Introducción.

1.1. Zona geográfica de colecta de hongos entomopatógenos: Distrito Federal.

El Distrito Federal (D.F.) cuenta con una superficie de 1500.45 Km²; se localiza al sureste de la Cuenca de México. La zona de reserva ecológica, al sur y suroeste del D. F. ocupa la mayor superficie de la entidad y comprende parte de las Sierras Ajusco-Chichinautzin y las cruces, donde se encuentran los Parques Nacionales Desierto de los leones y el Ajusco, así como los Dínamos, el Valle de las Monjas y el monte de las Cruces. Se encuentran también algunas reservas ecológicas hacia el norte y este, como la Sierra de Guadalupe, Parque Nacional Cerro de la Estrella y Sierra de Santa Catarina. Existen zonas hacia el oeste del D. F. en el área de las chinampas de Xochimilco y Tláhuac, donde prospera un pastizal resistente a las concentraciones de sales (INEGI, 2002).

El hecho que el D.F. sea el centro político, económico, financiero y cultural del país y que en él se concentre uno de los núcleos de población más grandes del planeta, hace pensar que su carácter es exclusivamente urbano; sin embargo, el 59% del territorio es suelo de conservación, en parte del cual se llevan a cabo actividades de producción rural y ecológicas; entre las que destacan la producción de maíz, avena forrajera, nopal, frijol, amaranto, alfalfa, hongos seta, hortalizas y flores. De la superficie del Suelo de Conservación, 62 000 hectáreas son de propiedad social (ejidos y comunidades), en las que habitan pueblos originarios. Cuarenta y seis pueblos aún cuentan con superficies destinadas a actividades agrícolas, sumando más de 30 mil hectáreas en cultivos y 7,000 en actividades pecuarias. (G. D. F., 2007).

1.1.1 Uso de suelo en el D. F.

El uso del suelo en el Distrito Federal se puede definir en dos grandes conceptos; la reserva ecológica y la zona urbana. La reserva ecológica del D. F. se constituye por bosques, matorrales, pastizales y la zona agrícola. La agricultura se divide en: de temporal, de riego y de humedad. En terrenos con pendiente o suelos altamente permeables se practica la agricultura de temporal. La agricultura de riego y de humedad (temporal) se localiza en zonas bajas y planas de Xochimilco y Tláhuac (INEGI, 2002). Estos territorios ubicados hacia el sur del D.F., están conformados por las superficies que constituyen poblados rurales y estructuras agrarias (ejidos y comunidades), en las delegaciones Álvaro Obregón, Cuajimalpa de Morelos, Magdalena Contreras, Tlalpan, Xochimilco, Tláhuac y Milpa Alta. (G.O. D. F., 2010).

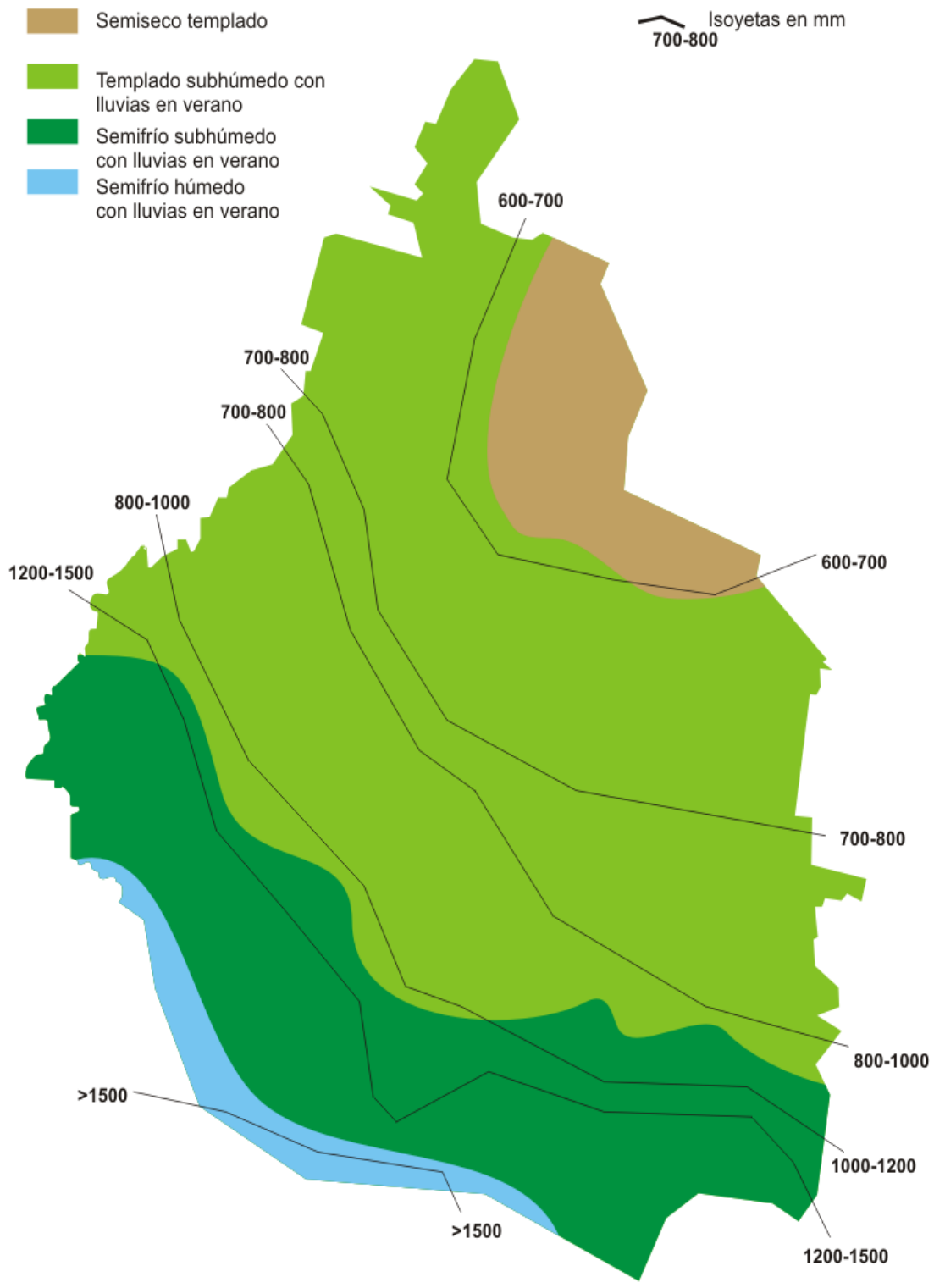


Figura 1.1 Distribución de climas en el Distrito Federal. Tomado de INEGI (2002).

1.2. Producción agrícola del D. F.

En cada una de las Delegaciones Rurales del D.F. se llevan a cabo actividades agrícolas, donde se producen los cultivos que en tabla 1.1 se describen.

Delegación	Cultivos
Álvaro Obregón	Maíz, frijol y avena
Cuajimalpa	Maíz y avena
Magdalena Contreras	Maíz, frijol, haba y ciruelo
Milpa Alta	Nopal verdura, avena, maíz, amaranto, hortalizas y flores
Tláhuac	Maíz, amaranto, espinaca, romeritos y acelgas, y en forma perenne: alfalfa, peral, higo, y nogal.
Tlalpan	Avena Forrajera, Maíz, Papa, Ryegrass, Chícharo, Rosa, Peral, Higo, Manzano, Ciruelo y Durazno
Xochimilco	Maíz, frijol, amaranto, girasol, sorgo, la papa, la veza de invierno y el maíz de ciclo corto para forraje, hortalizas, nopal, calabaza, chayote, chilacayote; frutales como el durazno, la ciruela roja y negra, el tejocote y el capulín.

Tabla 1.1. Productos agrícolas del D.F. Tomado de (SEDUVI, 2015 (a, b, c, d, e, f, g y h)).

1.3. Principales plagas que atacan a los cultivos agrícolas del D.F.

En la actualidad la producción de alimentos enfrenta el reto de mantener un alto nivel de calidad, considerando aspectos de inocuidad alimentaria y sistemas de producción con retribución más justa para los productores. (Gonzales-Castillo *et al.*, 2012). En el D.F. son frecuentes e importantes los daños causados en maíz por plagas conocidas como: el gusano elotero, el pulgón, gusano soldado, la araña roja, gusano cogollero y la gallina ciega (SENASICA, 2015(a)) y en nopal, el picudo, la grana-cochinilla, las arañas rojas y la chinche gris (INEGI, 2007); las mosquitas blancas, las chicharritas o los pulgones que atacan a las distintos cultivos. (Alatorre *et al.* 2000).

1.3.1. Plagas de maíz.

De acuerdo a sus hábitos alimenticios las plagas de maíz, se pueden dividir en dos grupos, los que atacan el follaje y tallo y, las plagas de raíz, misma que se enlistan en la siguiente tabla.

Follaje y tallo	Raíz
Trips (<i>Frankliniella williamsi</i>)	Gusano alfilerillo (<i>Diabrotica virgifera zeae</i>)
Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	Catarina del maíz (<i>Colaspis</i> sp.)
gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>)	Gusano de alambre (<i>Agriotes</i> sp.)
Gusano trozador (<i>Agrotis</i> sp.)	Gallina ciega (<i>Phyllophaga</i> sp, y <i>clocephala</i> sp., <i>Diplotaxis</i> sp., <i>Macrodactylus</i> sp., y <i>Anomala</i> sp.)
Gusano trozador (<i>Agrotis</i> sp.)	
Barrenador del tallo (<i>Diatraea</i> sp.)	
Frailecillo (<i>Macrodactylus mexicanus</i>)	
Picudos (<i>Geraeus senilis</i> , <i>Nicentrites testaceipes</i>)	
Araña roja (<i>Olygonychus mexicanus</i> y <i>Tetranychus</i> sp.)	
Chapulines, (<i>Sphenarium</i> sp, <i>Melanoplus</i> sp)	

Tabla 1.2. Plagas de importancia económica en maíz. Tomado de (CSAVEG, 2015).

1.3.2. Plagas de Nopal.

La entomofauna que daña al nopal es amplia, el grado de afectación depende de las especies de nopal y condiciones ambientales presentes. Las plagas principales son: el gusano blanco, *Leniifera cilcades* es plaga primaria en el Altiplano Potosino y la grana o cochinilla es plaga importante en el Estado de México. La palomilla del nopal *Cactoblastis cactorum* Berg es considerada potencialmente destructiva para diversas especies de Opuntia, especialmente en *O. ficus-indica*, la gallina ciega (*Phyllophaga* spp.), el gusano de alambre (*Diabrotica* spp), el picudo barrenador (*Cactophagus Metamasius spinolae* Gyllenhal), el picudo de las espinas (*Cylindrocopturus biradiatus* Champion), la chinche gris (*Chelinidea tabulat* Buermeister), la chinche roja (*Hesperolabops gelastops* Kirkaldy), el gusano blanco (*Leniifera cyclades* Druce), el gusano cebra (*Olycella nephelepasa* Dyar), el escarabajo barrenador (torito) (*Moneilema variolaris* Thompson), chinche gris (*Chelinidea tabulatus* Burmesiter), la grana o cochinilla (*Dactylopius indicus* Green), los Trips (*Sericothrips opuntiae* Hood), la perilla de la tuna (*Aceria cactorum*), la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*), el gusano cogollero (*Spodoptera* spp) y el caracol (*Helix aspera*) son de importancia económica (Vargas et al., 2008).

1.3.3. Plagas de Amaranto.

El cultivo de amaranto es atacado por una amplia gama de insectos de los cuales siete especies son consideradas como plagas potenciales. Los insectos que se alimentan del follaje y panoja son: *Sphenarium purpurascens*, *Epicauta cinerea*, *Spodoptera exigua* y *Pholisora catullus*; mientras que los insectos que dañan el tallo son *Herpetogramma bipunctalis* y *Amauromyza abnormalis* y quien daña la raíz es *Phyllophaga ilhuicaminai* (Torres *et al.*, 2011).

1.3.4. Plaguicidas empleados para su control.

Durante los últimos 40 a 50 años el combate a los insectos y ácaros que son plagas en la agricultura y el medio rural, se ha hecho principalmente por medio de insecticidas químicos (Parsa *et al.*, 2014). Esta práctica ha sido muy útil en la proyección de las cosechas a través de esos años, los cuales fueron exitosos en el control de plagas en sus inicios, minimizando las pérdidas de las cosechas. Sin embargo, como consecuencia de su uso inadecuado e indiscriminado, pronto aparecieron problemas de resistencia de los insectos hacia estos productos, así como un rápido crecimiento de las poblaciones de plagas secundarias y alteraciones ecológicas, causando efectos indeseables en el medio ambiente y en la salud del ser humano. Esto ha ocasionado la prohibición o restricción de muchos insecticidas como el dieldrín, mirex, BHC, paratión etílico, toxafeno y DDT (González-Castillo *et al.*, 2012)



Figura 1.2. Daño a la salud y ambiente con plaguicidas de origen sintético.

1.4. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

El Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), tiene la misión de desarrollar y establecer estrategias reglamentadas de control biológico para plagas, para ello genera y proporciona tecnología alternativa al uso de plaguicidas químicos. De igual modo, coadyuva con

programas o campañas fitosanitarias en las que se promueve el uso de organismos benéficos como agentes de control biológico, todo esto con la finalidad de fortalecer la sanidad de los cultivos vegetales en México, coadyuvando en el incremento de su productividad y calidad agrícola. El CNRCB también aplica la normativa en el caso de las importaciones de agentes de control biológico, y asimismo orienta y valida el buen uso de los insumos fitosanitarios empleados en el control biológico (SENASICA, 2015 (b)).

Actualmente el Servicio de Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria SENASICA desarrolla diversos programas con la finalidad de contar con una alternativa amigable con el ambiente y de protección de la salud pública. Esta estrategia ha tomado importancia y relevancia en el país, ya que se ha demostrado que genera bienestar a la agricultura del país, así como a la economía y sustento alimentario. Para fortalecer la investigación, se establecen vínculos para desarrollar más investigación en otras instituciones y se conforma un acervo documental acerca de este tipo de control. Para cumplir con las responsabilidades que por mandato están establecidas en la Ley Federal de Sanidad Vegetal, se han establecido los objetivos institucionales:

- Reglamentar y normar las Importaciones de agentes de control biológico y las actividades de control biológico de plagas bajo control oficial.
- Implementar y coordinar programas de control biológico de plagas reglamentadas en campañas fitosanitarias de la Dirección General de Sanidad Vegetal.
- Orientar y validar el buen uso de los insumos fitosanitarios utilizados para el control biológico de plagas reglamentadas por la Dirección General de Sanidad Vegetal.
- Generar, validar y transferir tecnología en control biológico de plagas bajo control oficial.
- Orientar la investigación y establecer vínculos para llevar a cabo acuerdos o convenios de cooperación nacional e interinstitucional para el desarrollo de la investigación, capacitación y transferencia de tecnología en materia de control biológico.
- Establecer, fomentar y mantener Colecciones de referencia de enemigos naturales, con el fin de apoyar la implementación de programas de manejo fitosanitario de plagas reglamentadas.
- Implementar la conformación de un Acervo documental de referencia y desarrollar bancos de información y bases de datos en aspectos de control biológico, incluidos directorios.
- Generar, fomentar y coordinar la elaboración de Impresos de divulgación sobre control biológico de las plagas reglamentadas por la Dirección General de Sanidad Vegetal (SENASICA, 2015 (b)).

1.5. Manejo integrado de plagas (MIP).

Diversas plagas se están combatiendo desde hace varios años mediante otros métodos y los productores están sustituyendo a los insecticidas por alternativas más ventajosas, como el manejo integrado de plagas (MIP). La definición de MIP más ampliamente difundida es la de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO): “El Manejo Integrado de Plagas es una metodología que emplea todos los procedimientos aceptables desde el punto de vista económico, ecológico y toxicológico para mantener las poblaciones de organismos nocivos por debajo del umbral económico, aprovechando, en la mayor medida posible, los factores naturales que limitan la propagación de dichos organismos” y como parte estratégica del MIP, el control biológico (CB). Aunque la adopción del MIP, no elimina la posibilidad de emplear insecticidas en algunas circunstancias, sin embargo, hay que reducir o eliminar el uso de los productos extremadamente y altamente tóxicos, optimizando el control biológico (Cañedo *et al.*, 2011).

El CB como parte del MIP, consiste en el control de plagas agrícolas mediante el uso de enemigos naturales de plagas: parasitoides (predadores) entomófagos y organismos entomopatógenos que pueden ser hongos, virus, nematodos, bacterias y protozoarios. Los hongos entomopatógenos (HE) han recibido mayor atención, la gran variedad de especies y amplio rango de hospedantes, así como por su crecimiento sobre la superficie de su huésped (Cañedo y Ames, 2004).

1.6. Hongos entomopatógenos.

Los HE como agentes de control biológico se utilizan en diferentes países, como una alternativa viable para regular los insectos fitófagos que afectan cultivos de importancia económica dentro de un programa de manejo de plagas (Angel-Cuapio, 2011). Estos hongos se encuentran en la naturaleza, en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc. Logran un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol; constituyen el grupo de mayor importancia en el CB de insectos plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por HE. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de HE. Entre los más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Isaria*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Roy *et al.*, 2006).

Los HE viven a expensas de insectos de diferentes órdenes en forma natural, representando un grupo importante, desde el punto de vista ecológico y económico. La mayoría de ellos se encuentran en las divisiones Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Roy *et al.*, 2006). Los HE poseen paredes celulares que se componen de β -glucanos y producen esporas no móviles asexuales (conidios), son unicelulares o filamentosos, acuáticos o terrestres. Los conidios

son las unidades infectivas y penetran el cuerpo del insecto produciéndole disturbios a nivel digestivo, nervioso, muscular, respiratorio, excretor; haciendo que el insecto se enferme, deje de alimentarse y posteriormente muera (Lacey y Kaya, 2000). El mecanismo de acción se divide en tres fases: la primera es la adhesión seguido de la germinación de la espora sobre la cutícula de del insecto; la segunda fase es la penetración en el hemocele y la tercera es la invasión o desarrollo del hongo sobre órganos y tejidos, misma que concluye con la muerte del insecto (Alean, 2003). Cuando el hongo penetra la cutícula hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos inhiben el crecimiento del hongo y se activa el sistema inmune a través de procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (St. Leger y Roberts, 1997). Los HE presentan diferentes estrategias para evitar el sistema de defensa de los insectos como cambios en la pared celular y producción de toxinas (Khachatourians, 1991).

1.7. Proceso infectivo de HE.

Durante la temporada de cultivo se pueden observar regularmente en las poblaciones de insectos en el campo los brotes de enfermedades, denominado epizootias. En general, el desarrollo de epizootias depende de la dinámica de acogida de la población hospedante, el número de fases infecciosas en la población del patógeno y la viabilidad de éstas, la eficiencia y el desarrollo de la infección (Meyling, y Eilenberg, 2007).

1.7.1 Adhesión y germinación de la espora.

El proceso de adhesión, dependiendo del hongo, puede ser un fenómeno específico o no específico. Mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual la espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al desarrollarse da origen a las hifas que penetran la cutícula, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. También puede producir una estructura llamada apresorio, misma que ayuda en la perforación de la cutícula. El éxito de la germinación y penetración no dependen necesariamente del porcentaje de germinación, sino del tiempo de duración de la germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad del hospedante (Shah y Pell, 2003). Los HE, además, pueden infectar a los insectos a través de las aberturas corporales como son cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas. Las esporas pueden germinar rápidamente en estos ambientes por ser húmedos. Cuando lo hacen en los fluidos digestivos, en este caso, el insecto no muere de micosis, sino a causa de las toxinas (Boucias y Pendland, 1998).

1.7.2. Colonización del hemocele.

Ángel-Cuapio, (2011) menciona que la penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el apresorio. Además, depende de las propiedades de la cutícula, grosor, presencia de sustancias nutricionales y antifúngicas, así como del estado de desarrollo del insecto. En este contexto Montesinos-Matías *et al.*, (2011), corroboraron que el tegumento de los insectos es degradado por los hongos mediante enzimas como proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases y quitinasas.

1.7.3. Muerte del insecto (reproducción).

Una vez en el hemocele, el hongo puede evitar la defensa inmune del insecto produciendo células parecidas a levaduras, llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente desarrollando protoplastos, elementos discretos ameboides, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante (Pérez, 2004) y produciendo micotoxinas (Glare, 2004), que causan la muerte del insecto, entre estas toxinas se han encontrado dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Monzón, 2001).



Figura 1.3. Multiplicación del hongo entomopatógeno en un hospedante.

1.8 Pros y Contras en el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico

1.8.1. Atributos e impacto en el uso de los hongos entomopatógenos.

Las ventajas que presenta los HE son: grados variables de especificidad que, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas. En el caso de cepas, pueden ser específicas a nivel de especie de insecto, sin afectar a otras poblaciones. Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones. Se pueden aplicar mezclas de HE con dosis subletales de insecticidas para lograr efectos sinérgicos

superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado; no contaminan al medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores. Cuando el hongo no llega a causar la muerte directa, se presentan efectos secundarios que alteran el normal desarrollo del ciclo de vida del insecto. Los HE poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprófita sobre material vegetal en descomposición. El crecimiento saprófita puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidios y desarrollo micelial, lo cual permite que el hongo se pueda cultivar en el laboratorio. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos (Cañedo y Ames, 2004)

1.8.2. Desventajas en el uso de los hongos entomopatógenos.

Pero también presentan algunas desventajas, como son: sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas con el uso de aditivos (protectores solares, aceites, antidesecantes); requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad. En general no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después su aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente. Sin embargo, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño (Cañedo y Ames, 2004).

1.9. El suelo.

El suelo es un sistema dinámico que responde a los cambios ambientales y suministro de energía e incluye factores ambientales como materia orgánica, humedad, pH, actividad microbiana, atmósfera gaseosa y temperatura, entre otros (Berlanga-Padilla *et al.*, 2015). Considerando la enorme importancia del suelo como un “sistema sustentador de la vida”, se conoce mucho acerca de la formación de los suelos, su composición química y física, también conocemos un enorme número de organismos del suelo. Por otro lado, nuestro conocimiento de la tierra como un biotopo es menos extensa. El biotopo es un área de condiciones ambientales uniformes que provee espacio vital a un conjunto de flora y fauna. El biotopo es casi sinónimo del término hábitat, con la diferencia de que hábitat se refiere a las especies o poblaciones, mientras que biotopo se refiere a las comunidades biológicas (Margalef, 1991). Así, aunque ciertas relaciones autoecológicas se han elucidado en detalle, se conoce bastante menos acerca de los procesos demoecológicos y sinecológicos (Keller y Zimmermann, 1989), entendiéndose como proceso demoecológico al estudio de las poblaciones formadas por los organismos de una misma especie desde el punto de vista de su tamaño (número de individuos), estructura (sexo y edad) y dinámica (variación en el

tiempo). Y sinecológicos al estudio de la composición y estructura de las comunidades formadas por especies diferentes; los cambios que ocurren en el tiempo y las relaciones entre las especies de la comunidad (Margalef, 1991), por lo que las interacciones de corto plazo son muy importantes e interesantes. Asimismo, aunque las interacciones particulares entre HE y sus artrópodos hospedantes son bien entendidos, se sabe menos de la importancia de las interacciones en el ecosistema (Keller y Zimmermann, 1989).

Estas investigaciones se presentan muy dificultosas, por el gran número y diferentes tipos de suelo, comunidades vegetales y consecuentemente los organismos del suelo y sus diferentes interacciones. En la naturaleza de los suelos utilizados con fines agrícolas subyacen influencias artificiales adicionales, tales como: agricultura, rotación de cultivos, periodos de barbecho y la aplicación de fertilizantes y pesticidas (Keller y Zimmermann, 1989).

Comparado con los demás hábitats principales, aire y agua, los suelos son caracterizados por la ausencia de luz y por el efecto buffer que posee contra influencias extremas de factores biótico y abióticos. El suelo es un excelente hábitat para microorganismos y artrópodos. Consecuentemente el número de especies es muy diferente entre hábitats. La mayoría de estos organismos viven exclusivamente en el suelo, pero otros pasan solo una parte de su vida en el suelo, usualmente la etapa larval, pupal o el periodo invernal. Correspondiendo con esta riqueza variedad de organismos, existe una riqueza de interacciones entre especies y grupos de organismos: antagonismo, comensalismo, sinergismo, predación, parasitismo, patogenicidad y competencia dominan la vida del suelo (Keller y Zimmermann, 1989).

1.9.1. Factores que afectan el suelo.

Las interacciones entre la microflora y fauna del suelo son numerosas y, generalmente influenciadas por los factores físicos y químicos del hábitat. Para una mejor comprensión de este fenómeno, la principal característica física que afecta a microorganismos e insectos que habitan el suelo, son brevemente esbozados: La ausencia de luz visible y ultravioleta es el principal factor del ambiente aéreo, excluye cualquier influencia de la profundidad en el crecimiento, reproducción, comportamiento de cualquiera de los dos. De esta forma, factores como:

- La textura del suelo (arena, limo y arcilla), juega un significativo papel determinante en la actividad microbiana.
- El agua, tiene influencia en la sobrevivencia, germinación y crecimiento de los HE en el suelo, esta enormemente influenciado por el potencial de agua.

- La atmosfera, en suelos normales con buen drenaje, los huecos están llenos de aire; el volumen total de aire, sin embargo, es determinado principalmente por el tamaño de partícula y el contenido de agua. La concentración de oxígeno y dióxido de carbono en el suelo juega un significativo papel determinante en la actividad, densidad y diversidad de organismos en diferentes tipos de suelo.
- El pH del suelo, influye altamente en la microflora del suelo. En general, alta acidez ocasiona disminución en el crecimiento de bacterias y aumenta el de hongos del suelo. Los suelos alcalinos son más adecuados para bacterias y los hongos toleran condiciones ácidas. Además, el pH de los suelos está estrechamente asociado con la disponibilidad de muchos nutrientes.
- La temperatura del suelo, es uno de los factores clave que influyen en la composición y actividad de la microflora y fauna del suelo. Ello depende en gran medida de aspectos de localización geográfica y el gradiente de pendientes de la superficie, exposición, color del suelo y la naturaleza de la cobertura vegetal y
- Prácticas agrícolas, tales como arar la tierra, rotación de cultivos y aplicación de pesticidas puede radicalmente alterar la población de organismos del suelo. Esto puede ser debido a su desecación, cambios en la aireación del suelo, un efecto directo de los pesticidas en organismos o no objetivo o por la adición de material orgánico (Keller y Zimmermann, 1989).

1.10. Diversidad y distribución de los hongos entomopatógenos.

La distribución y abundancia de los HE en el mundo ha sido estudiada y en particular en las zonas templadas, encontrándose a *Beauveria bassiana*. (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) como las especies más abundantes (Bidochka *et al.*, 1998; Klingen *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2003; Meyling y Eilenberg, 2006; Meyling *et al.*, 2009).

La diversidad y abundancia de los hongos entomopatógenos es afectada por factores bióticos y abióticos, ya que pueden disminuir su capacidad de sobrevivir, propagarse e infectar a su hospedante; entre los factores más importantes se mencionan la radiación UV, temperaturas altas y desecación (Cardona, 1998; Gottel *et al.*, 2000). Los conidios son susceptibles a la radiación ultravioleta (UVB) cuya porción del espectro solar es de 295 a 320 nm, afectando la persistencia de estos en el sustrato donde se encuentren (Galvaio y Bettiol, 2014). Con respecto a la temperatura, la mayoría de los entomopatógenos tienen un amplio rango de tolerancia a temperaturas, pero para crecer y esporular generalmente está entre 20 y 30 °C (Godoy *et al.*, 2007). En la mayoría de las especies los conidios pueden sobrevivir a temperaturas bajo cero, lo cual facilita su almacenamiento

por largos periodos en laboratorio a -20 °C o en nitrógeno líquido a -196° C (Gottel *et al.*, 2000; López-lastra *et al.*, 2002). Estudios recientes han identificado algunas cepas de *M. anisopliae* que pueden tolerar temperaturas de hasta 48° C sin afectar su actividad biológica (Rangel *et al.*, 2005; Li y Feng, 2009).

Como se mencionó anteriormente, la humedad es importante para la esporulación y germinación de los conidios, los hongos requieren de una humedad alta para iniciar una epizootia natural (Gottel *et al.*, 2000; Hussein *et al.*, 2010). El impacto de la lluvia en la persistencia de conidios sobre el insecto y en follaje se ha estudiado extensamente, debido a que remueve los conidios del integumento del insecto adulto o larva; sin embargo, medir los efectos de la lluvia en la persistencia de estos hongos en campo se dificulta por la confusión de variables, la rápida desactivación del conidio por radiación solar no permite estimar un efecto real de la precipitación en la persistencia de los conidios a través del tiempo (Goettel e Inglis, 1997). También se ha determinado que el tipo de suelo puede tener un efecto en la diversidad y abundancia de estos microorganismos, ya que *B. bassiana* se ha reportado con mayor abundancia en suelos arcillosos, con un pH alto y bajo contenido de materia orgánica, siendo estas dos últimas variables importantes en la presencia de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Quesada-Moraga *et al.*, 2007).

1.11. Colecta de muestras de suelo e insectos.

Durante los últimos 25 años, a través del mundo muchas especies de hongos han sido encontrados infectando insectos que habitan en el suelo. Las formas habituales de colectar HE de insectos de suelo, incluye buscar insectos muertos infectados o vivos que, luego son criados en el laboratorio, donde posteriormente se observa la incidencia de micosis (Keller y Zimmermann, 1989). Ambos insectos, vivos y muertos pueden ser encontrados infectados por HE en casi todos los entornos, incluidos los ecosistemas terrestres, acuáticos naturales y agroecosistemas (Lacey y Brooks, 1997). Algunas especies se pueden encontrar en hábitats agrícolas y naturales (Meyling y Eilenberg, 2007). *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. tienen una distribución y un amplio rango de insectos hospedantes (Bidochka *et al.*, 1998).

Los insectos colectados deben ser etiquetados con los datos del nombre del colector, nombre del insecto colectado, lugar de colecta, cultivo y fecha. Colectar consiste en recoger insectos vivos o muertos, en el follaje, axilas, tallos, corteza de los árboles, sobre la superficie o en el interior de éstos, en el suelo, inclusive en crianzas masivas de laboratorio. Si el insecto se encuentra pegado a una superficie, es necesario cortar la porción del sustrato que lo contiene y colocarlo en una placa o frasco. El material se conserva mejor si se mantiene a bajas temperaturas (Cañedo y Ames, 2004).

En el caso de que los ejemplares colectados sean de raíz, se depositan en hielera con *peat moss* para trasladarlas al laboratorio y almacenadas 4° C (Carrillo *et al.*, 2013).

Cuando se colecta suelo, los sitios muestreados son ubicados con geoposicionador satelital y las muestras son etiquetadas con los siguientes datos: número de colecta, nombre del colector, fecha de colecta, cultivo y localización geográfica. Las muestras se conservan en cuarto frío a 4 °C hasta su procesamiento (Hernández *et al.*, 2011). Se toman de tres a cinco submuestras de suelo de 500 g a una profundidad de 10 a 15 cm de la superficie en cada zona de muestreo (M1, M2, M3, M4 y M5). Se recomienda procesar las muestras lo más pronto posible, usualmente dentro de los primeros 5 días después de la colecta (Zimmermann, 1986).

1.12. Aislamiento de hongos entomopatógenos.

Este método fue desarrollado por Zimmermann, (1986), originalmente era para aislar nematodos entomopatógenos de muestras de suelo (Meyling, 2007). Larvas de *Galleria mellonella* se utilizan para aislar cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsche.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull., e *Isaria fumosorosea* de distintas localidades (Zimmermann, 1986). El suelo es generalmente el ambiente de aislamiento convencional de los HE (Keller y Zimmermann, 1989). La HE silvestres pueden ser aislados a partir de suelo colectado, ya se utilizando la técnica del insecto trampa o a través de medio de cultivo selectivo (Berlanga-Padilla *et al.*, 2015) y de insectos vivos o muertos micosados colectados en campo (Keller y Zimmermann, 1989).

1.12.1. Aislamiento de suelo, utilizando el insecto trampa.

En estudios de ocurrencia natural de HE en suelo, se han utilizado insectos cebo tales como *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) o *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), por lo general se añaden a muestras de suelo a fin de recuperar aislados fúngicos; en principio, el método puede ser descrito como el uso de medios selectivos (Meyling, y Eilenberg, 2007), porque que sólo los hongos que son patógenos de estos insectos ocasionaran infección sobre las larvas, lo que facilita su aislamiento (Berlanga-Padilla *et al.*, 2015).

Los aislamientos se obtienen de la siguiente forma: se depositan 200 g de suelo húmedo en contenedores de plástico, se agregan de 15-20 larvas de *Galleria mellonella* o *Tenebrio molitor* del 4 estadio; se tapan, y se incuban a 27°C por 14 días. Periódicamente el suelo se invierte para asegurar que la larva permanezca expuesta al hongo, después de 7 días de incubación, las larvas

mueras serán separadas del contenedor de plástico, posteriormente se desinfectan superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril y se colocaron sobre papel filtro a fin de remover el exceso de humedad; se incuban individualmente en cajas de Petri a 25 °C (Zimmermann, 1986) y a una humedad relativa (HR) de 97%, mantenida con K₂SO₄ al 11% (Goettel e Inglis, 1997). Alternativamente las larvas retiradas del trapeo, primero pueden ser desinfectadas con etanol al 70% por un minuto, un segundo lavado en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, después se lavan con una solución estéril de Tween 80 al 0.03%, se secan y se colocan en cámara húmeda. Finalmente los hongos desarrollados sobre la superficie de los insectos, se aíslan en condiciones de esterilidad y se siembran en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) (Carrillo *et al.*, 2013), o en Agar Papa Dextrosa (PDA), fitolevadura y miel peptona agar y/o adicionados con antibióticos (Cañedo y Ames, 2004).

1.12.2. Aislamiento de suelo, utilizando medios selectivos

Este método se basa en realizar alícuotas de suelo con 0.35 g ± 0.05 g en tubos Eppendorf de 2 ml de capacidad. Se agrega 1 ml de agua destilada estéril a cada tubo, se agita por 30 segundos y se toma alícuota de 50 µl para sembrar en placas Petri con medio de cultivo (ADS), se incuban a 27 ± 1°C; se resiembran colonias sospechosas de ser HE a medio de cultivo selectivo específico, como medio adicionado con Cloranfenicol, Tiabendazol y Ciclohexamida (Berlanga-Padilla *et al.*, 2015), tetraciclina o estreptomina. El principal obstáculo para el aislamiento de HE con medios selectivos es su crecimiento lento comparado con el de los hongos saprobios oportunistas que se encuentran en suelo (Meyling, 2007).

1.12.3. Aislamiento a partir de insectos con o sin micosis.

Los insectos colectados para aislamiento de HE pueden ser vivos y muertos con o sin presencia de micosis (Keller y Zimmermann, 1989). Los insectos colectados vivos, se colocan en vasos de plástico con peat moss húmedo con agua estéril e incubados a 25 °C durante 40 días (Carrillo *et al.*, 2013) o en cajas de Petri incubadas a 27° C (Hernández *et al.*, 2011); se revisan cada 7 días los insectos y los que presentan infección ocasionada por hongos, son limpiadas con pincel para quitar el exceso de sustrato, se desinfectan, se colocan en cámara húmeda y se siembran en medio de cultivo; siguiendo el método de Zimmermann (1986) o la modificación al método, sugerido por Carrillo *et al.* (2013). En el caso de los insectos colectados muertos con micosis, se limpian, desinfectan, colocan en cámara húmeda y siembran siguiendo el método ya explicado anteriormente.

1.13. Identificación de los asimientos.

1.13.1. Identificación morfológica.

La identificación de la mayoría de los hongos entomopatógenos depende necesariamente de la observación de caracteres microscópicos. Muchos entomopatógenos comunes pueden ser fácilmente identificados hasta género o, en algunos casos, hasta especie por la observación, ya sea a simple vista, o bajos aumentos de lupas o microscopio estéreo. Las identificaciones de especies por lo general requieren la confirmación de sus caracteres microscópicos esenciales (Humber, 2012). Los hifomicetes constituyen una clase de hongos que poseen conidioma hifal libre y se reproducen por esporas asexuales denominadas conidios. Los conidios nacen en células especializadas (células conidiógenas) de los conidióforos. Durante muchos años los hongos conidiales se denominaron como “Fungi imperfecti” u “hongos imperfectos” por su modo de reproducción asexual a través de la mitosis. Numerosos son los sistemas artificiales creados con el objetivo de clasificar dichos hongos al usar sus caracteres morfológicos, fundamentalmente basados en los conidios y conidióforos (Castañeda 2001).

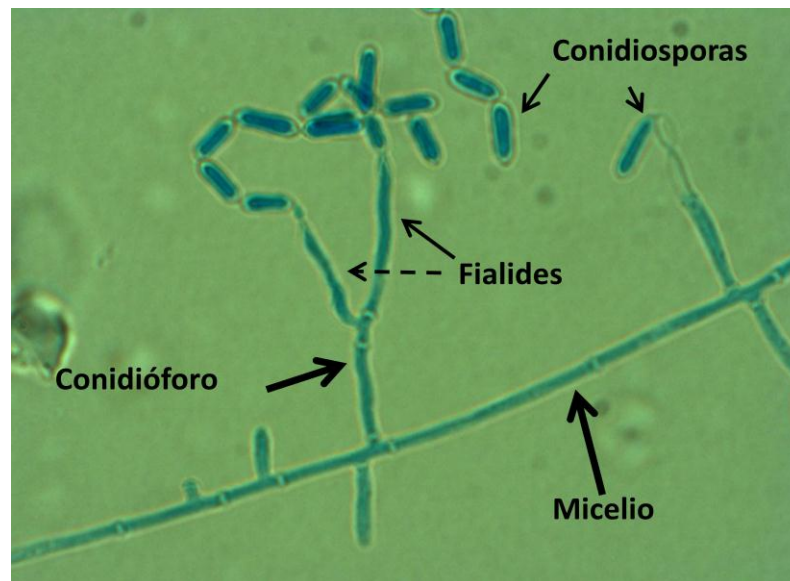


Figura 1.4. Estructuras reproductoras de un hongo entomopatógeno

1.13.2. Identificación molecular.

Los aislados requieren ser identificados a nivel molecular para asegurar su autenticidad, riesgos a la salud y seguridad durante su manejo para los investigadores o usuarios en su posible aplicación como bioplaguicidas (SENASICA, 2015 (c)).

La identificación molecular se realiza con base en el análisis de las secuencias llamadas espaciadores transcritos internos (ITS), que son secuencias de ADN ribosómico (ADNr) contenida en los cromosomas. Estas regiones de ADNr se denominan también regiones de organización del nucléolo. Los genes de los ARNr 18S, 5'8S y 28S están agrupados en una única unidad de transcripción. El transcrito de mayor longitud es el precursor a partir del cual, por medio de una serie de reacciones intermedias, se generan los tres ARNs. La unidad de transcripción completa contiene dos segmentos de ADN espaciadores, no codificantes, llamados ITS, que separan a las tres regiones codificantes unas de otras. Los ITS difieren muchísimo en secuencia y en organización de una especie a otra. La única característica común de las secuencias ITS entre distintas especies es la presencia de repeticiones directas organizadas en tándem, que secuencias de entre 5 y varios cientos de nucleótidos que se repiten en orden de manera consecutiva, de modo que secuencias idénticas, o casi, se disponen unas detrás de otras miles de veces generando regiones repetidas con tamaños que oscilan entre 100,000 nucleótidos hasta varias megabases. La secuencia de la unidad de repetición es propia de cada organismo. El nivel bajo de polimorfismo en la unidad de transcripción de ADNr permite la caracterización de cada especie usando sólo unos pocos ejemplares y hace que este ADN sea útil para la comparación interespecífica. Además, las repeticiones de las diferentes regiones de codificación del ADNr muestran distintas tasas de evolución. Como resultado de ello, este ADN puede proporcionar información sobre casi cualquier nivel sistemático (Hillis y Dixon, 1991).

1.14. Desarrollo de bioplaguicidas.

1.14.1 Producción masiva.

La producción masiva de HE para el control de insectos plaga es un requisito necesario para su aplicación en gran escala. El método utilizado depende generalmente del organismo en cuestión y el producto final deseado. La producción de HE puede ser en medio sólido o en fermentación sumergida, teniendo la producción en medio sólido más ventajas para la producción de *Metarhizium anisopliae* (Porcayo, 2014). Su producción se basa la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya, pero lo más utilizados son arroz y trigo (López-Pérez *et al.*, 2014).

Se tienen avances aplicados a la cosecha, formulación y producción en masa de *Metarhizium*. Pero es de gran importancia, determinar para cada cepa fúngica el sistema a emplear: el sustrato óptimo, el momento adecuado para cosechar la producción en masa y las condiciones efectivas para el almacenamiento, incluyendo el contenido de humedad, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura

y el tipo de envase (Roberts y St Leger, 2004). La estabilidad, viabilidad y persistencia en campo de los entomopatógenos es en gran medida determinada por el tipo de formulación (Cortez-Madrigal, 2006). Para Fernández y Juncosa (2002), la temperatura y la humedad son las principales limitantes para la eficacia en la germinación de esporas, infección y desarrollo.

1.14.2. Pruebas de calidad.

El éxito en el desarrollo de un bioplaguicida tiene su origen en el control de calidad, debe realizarse con mucho rigor, debido a que es el inicio del proceso de producción y la selección de la cepa y del cultivo puro. La presencia de contaminantes afectará los siguientes pasos del proceso, y por consiguiente la calidad y el rendimiento del producto obtenido. En el proceso de producción de HE el control de calidad constituye un factor clave. Este consiste en la evaluación rigurosa de la calidad en cada uno de los pasos del proceso de producción. Su objetivo es evitar los problemas de contaminación y garantizar la calidad del hongo producido y obtención de cultivos puros, con buenas características de crecimiento y de eficacia para el control de la plaga (Monzón, 2001), ya que, bajo condiciones de campo se han reportado inconsistencias en el efecto fungicida de los HE, debido a factores relacionados con el medio ambiente tales como la temperatura, los rayos ultravioleta (UV) (Samish *et al.*, 2004), estrés osmótico y oxidativo (hemolinfa) (Shuyang *et al.*, 2012).

1.14.2.1. Germinación.

La germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al crecer y alargarse da origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. La espora que germina en el insecto forma un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula. También puede producir una estructura llamada apresorio, la cual ayuda a la adhesión de la espora (Shah y Pell, 2003). El éxito de la germinación y penetración no dependen necesariamente del porcentaje de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad del hospedante (Cañedo y Ames, 2004). De acuerdo con Ibrahim y Jenkinson, (2002) un conidio ha germinado cuando la longitud del tubo germinativo es mayor que su diámetro.

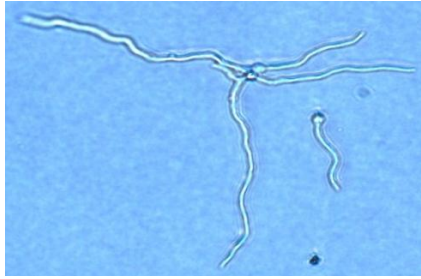


Figura 1.5. Germinación a las 15 h de conidios de un entomopatógeno del género *Metarhizium*.

1.14.2.2. Germinación en condiciones de hiperosmolaridad (Estrés osmótico).

La actividad del agua se define como el potencial químico del agua libre en solución; variaciones en este potencial, que en la naturaleza pueden ser numerosas y repentinas, causan uno de los estreses ambientales más comunes, el estrés osmótico. Las células pueden tener que enfrentarse tanto a una situación de choque hiper-osmótico, que causaría salida de agua y pérdida de volumen, como a un choque hipo-osmótico, con efectos contrarios a la situación anterior. Generalmente es la condición de choque hiperosmótico la que se define como estrés osmótico (de Nadal *et al.*, 2002).

Una célula expuesta a un medio con elevada osmolaridad puede deshidratarse, sufrir un colapso de los sistemas de transporte iónico con un incremento en la concentración de biomoléculas e iones que puede, incluso, causar la pérdida de la viabilidad. Las alteraciones del volumen celular causan también cambios en la estructura real. El estrés osmótico puede dañar aspectos importantes de la fisiología celular como el crecimiento, el transporte vesicular y el nivel estructural de las membranas, incluyendo la expresión de genes del metabolismo lipídicos, la flexibilidad y permeabilidad de la membrana celular. El estrés osmótico viene acompañado de un estrés salino, debido a un descontrol en el balance de iones y cationes, que puede ser tóxico para la célula. La regulación de estos niveles se lleva a cabo a través de bombas iónicas específicas de las membranas plasmáticas y vacuolares y de reguladores específicos del potencial de membrana (de Nadal *et al.*, 2002).

En este contexto, Shuyang *et al.*, (2012) reportan que la eficacia de los HE en el control de plagas, se ve afectada principalmente por diversos factores ambientales: el calor, la radiación UV-B y por las respuestas del insecto huésped, tales como estrés oxidativo y estrés osmótico.

1.14.2.3. Termotolerancia.

Uno de los principales factores que pueden afectar la persistencia y eficacia en campo a los HE, es la termotolerancia que poseen las cepas (Toriello, 2008; Hussein *et al.*, 2010), siendo para *Metarhizium anisopliae* 37° C la temperatura límite máxima para la germinación de sus conidios

(Walstad *et al.*, 1970; Li and Feng 2009) y de 37 a 40° C para el crecimiento hifal (Li and Feng 2009). Aunque, estudios recientes han identificado cepas de *Metarhizium anisopliae* que toleran temperaturas de 48° C sin afectar su actividad biológica (Li and Feng 2009; Rangel *et al.*, 2005). Debido a las inconsistencias que existen entre los resultados generados en condiciones de laboratorio y de campo, la evaluación de la termotolerancia de los HE es un paso necesario cuando se evalúan diferentes cepas, con base en ello, Li and Feng, (2009) sugieren evaluar la termotolerancia para *M. anisopliae* a temperaturas entre 45 y 48° C. Por lo anterior, es necesario conocer la temperatura óptima para el desarrollo de los aislamientos de estos hongos, con el fin de liberarlos en las regiones y épocas en las cuales las temperaturas sean adecuadas (Berlangua-Padilla y Hernández-Velázquez, 2002).

1.15. Preservación.

La investigación sobre microorganismos requiere conservar y almacenar el material microbiano de interés puro y debidamente identificado, para garantizar la idoneidad y reproducibilidad en la experimentación, por esto es necesario contar con métodos de conservación *ex situ*. El manejo de microorganismos contempla métodos de conservación de largo plazo, con los que se paraliza el crecimiento de las células microbianas sin causar pérdida de viabilidad. Así, se avala la estabilidad genética al limitar la aparición de generaciones sucesivas y la latencia durante varios años. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo incluyen: criopreservación a -20 ó -80° C en glicerol al 10%, liofilización, agua destilada estéril y aceite mineral (Gutiérrez *et al.*, 2009). Sin embargo, el mejor método para preservar los HE es con nitrógeno líquido como crioprotectante a -196° C, ya que mantiene su viabilidad celular y conserva sus propiedades biológicas (inefectividad y virulencia) (López-Lastra *et al.*, 2002). La viabilidad es la cantidad de conidios que tienen la capacidad de germinar después de un periodo prolongado de almacenamiento, expresada en porcentaje. El estándar recomendado para la utilización de HE como agentes de control biológico es una viabilidad mayor del 80% (Berlangua-Padilla, 2006; Ángel-Cuapio, 2011). La eficacia de los microorganismos utilizados como principio activo de bioplaguicidas está directamente relacionada con su viabilidad y puede ser afectada por diferentes factores ambientales (Samish *et al.*, 2004).

1.16. Productos comerciales elaborados con base en hongos entomopatógenos.

A nivel mundial, desde la década de 1960 un número considerable de productos bioplaguicidas se han desarrollado, y de 174 bioplaguicidas comercializados en todo el orbe, el 33.9% está elaborado con base en *Beauveria bassiana*, 33.9% en *Metarhizium anisopliae*, 5.8% en *Isaria fumosorosea*, 4.1% en *B. brongniartii* y el 10% restante en diversas especies de HE (Faria y Wright, 2007). En la actualidad, muchos de los bioinsecticidas comercializados están basados con los HE *B. bassiana* o

M. anisopliae. Estas dos especies, tienen amplios rangos de hospederos. Botanigard es un producto en emulsión líquida realizada con conidios de *B. bassiana* mientras que Mycontrol está elaborado con polvo de conidios (Glare, 2004). Durante el 2007 el mercado mundial estuvo dominado por los productos BEA-SIN, Botani-Gard 22WP, Mycontrol, Mycotol, Meta-Sin, PAESIN, FITOSAN y Biofung elaborados con base principal de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* y en menor medida productos como Best, Best Ultra S, MildOut, Biobacter C, Nemaxxion Biol que se elaboran con otros HE (Alatorre-Rosas, 2007). Para en el 2013 el 36% de 160 catálogos de bioinsecticidas comercializados fueron elaborados con el HE *Beauveria bassiana*. y los productos se vendían bajo diferentes nombres, tales como BotaniGard o Mycotrol, basado en la cepa GHA de *B. bassiana* de la empresa Laverlam Internacional, anteriormente Esmerald Bioagricultura Corp. o Mycotech Corp (López *et al.*, 2014).

2. Antecedentes.

Fue Agostino Bassi quien descubrió a los HE, al encontrar que un microorganismo era el agente causal de enfermar y matar al gusano de la seda y, que esta patología se transmitía a otros gusanos de la seda, más tarde este microorganismo sería llamado *Beauveria bassiana*. En 1878 Eli Mechnikoff cultivó masivamente a *M. anisopliae* como primer agente de CB. La aplicación de los hongos en inoculaciones masivas contra las plagas de insectos comenzó con Krassilstchik en 1888; con el desarrollo de plaguicidas de origen químico, el conocimiento de los HE se frenó y fue hasta la década de 1960 del siglo pasado, cuando los problemas ambientales hicieron retomar el interés en ello. El desarrollo de la cepas *M. anisopliae* var. *acridium* fue todo un éxito en la lucha contra la langosta en varios países. Inicialmente, una cepa de este hongo se desarrolló en África, bajo un programa llamado LUBILOSA, lo que llevó al desarrollo del bioplaguicida comercial “Green Muscle”. Este programa ha inspirado el desarrollo de cepas autóctonas de *M. anisopliae* var. *acridium* en otros países. Por ejemplo, en Australia el éxito del Programa LUBILOSA se ha duplicado con el desarrollo del GREEN GUARDE, basado en un aislado australiano de *M. anisopliae* var. *acridium* y de otro aislado de *M. anisopliae*, se ha desarrollado un bioinsecticida llamado BioCane para el escarabajo de la caña (*Dermolepida albobirtum*). En Colombia distintos hongos entomopatógenos han sido probados contra (Díptera: *Cecidomyiidae*) que infesta el tomate (Travis, 2004).

Los hongos son uno de los miembros más activos de la comunidad biológica del suelo. Muchos hongos saprofito y parásitos facultativos viven en el suelo. (Ghanbary *et al.*, 2009). Los HE tienen una distribución mundial y de suelo se han aislado cepas de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* o *isaria fumosoroseus*. (Keller *et al.*, 2003; Hajek, 1997; Zimmermann, 1986 y, Meyling y Eilenberg, 2007).

En la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-1) se tienen distintas líneas de investigación con cepas HE. Las cepas con las que actualmente se cuenta son: *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, *M. anisopliae* 59, *Beauveria bassiana* 88 e *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF 3302 que, son los que constituyen la colección de la UAM-1, dentro de esta colección, aún no se conocen los HE endémicos del suelo del D.F.

3. Justificación.

Casi el 60% del territorio del D.F. es de uso agrícola, en él se llevan a cabo el cultivo de diversos productos agrícolas como el amaranto, maíz, hortalizas, leguminosas, plantas medicinales, aromáticas y ornamentales ((INEGI, 2002). Los problemas fitopatológicos que estos cultivos enfrentan son diversos, aunado a los elevados costos de producción que los agricultores tienen que desembolsar por la aplicación de plaguicidas de origen sintético. La problemática se agrava, pues muchos de plaguicidas son tóxicos con el medio ambiente, además de afectar la salud humana (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2010). En el suelo existe variedad de insectos, protozoarios, bacteria, virus, nematodos y hongos, que en su conjunto son parte de la microbiota benéfica del suelo, cuya contribución radica en la disminución de las pérdidas de los productos agrícolas, ocasionados por el ataque de plagas de insectos (Alatorre *et al.* 2000). El conocimiento de la macro y microbiota es de suma importancia y en particular para este trabajo, el conocimiento de los HE que habitan en el suelo agrícola del D.F. es de gran importancia para su aprovechamiento sustentable, con fines en la sustitución de los plaguicidas de origen sintético comúnmente utilizados por los productores del D.F., ya que, el uso de cepas endémicas ofrece grandes contribuciones a los agroecosistemas (Meyling y Eilenberg, 2007).

Actualmente no se han desarrollado trabajos sobre al aislamiento de los HE del suelo agrícola del D.F. Por lo tanto, este trabajo dará inicio al conocimiento de la diversidad de HE presentes en suelo agrícola del D.F. para el desarrollo de cepas utilizables en programas integrales de plagas en las zonas agrícolas del D.F.

4. Hipótesis.

Los hongos entomopatógenos aislados de suelo agrícola del Distrito Federal tendrán una calidad similar a los hongos entomopatógenos de preparaciones comerciales.

5. Objetivos

5.1. General.

Aislar cepas de hongos entomopatógenos de suelo agrícola del Distrito Federal y comparar su calidad con una cepa comercial.

5.2. Particulares.

1. Aislar hongos entomopatógenos de suelo de 5 Delegaciones agrícolas del D.F.
2. Identificar morfológica y molecularmente los aislados.
3. Depositar muestras de todos los aislamientos obtenidos en el CNRCB.
4. Preservar al menos un aislado de cada Delegación en dos métodos.
5. Caracterizar el suelo del que se obtuvieron los aislados.
6. Determinar la producción de conidios en arroz de los aislados seleccionados Vs una cepa comercial.
7. Comparar la calidad de conidios de los aislados seleccionados con una cepa comercial.

6. Materiales y métodos.

6.1. Desarrollo de la clave de los aislados

El primer aspecto de la metodología fue desarrollar una clave para cada aislado y con ella identificar a la Delegación de donde fueron obtenidos. De esta forma se determinó constituir la clave de tres a cuatro letras que son parte del nombre de cada delegación considerada; además de designar y representar a cada aislado, los diferencia entre las distintas delegaciones muestreadas del D.F. También se buscó, que la frase o sonido generado para cada abreviación no tuviesen parecido entre ellas. Así las claves de las siete delegaciones rurales agrícolas del D.F., con las que en lo sucesivo se identificará y escribirá después del respectivo nombre científico, se muestra en la tabla 6.1.

Delegación	Clave
Álvaro Obregón	Alo
Cuajimalpa	Cuj
Magdalena Contreras	Mag
Milpa Alta	Mia
Tláhuac	Tac
Tlalpan	Tap
Xochimilco	Xoch

Tabla 6.1. Claves asignadas a cada Delegación.

6.1.1. Clave para aislamientos plurispóricos.

Una vez obtenida la clave de cada delegación, se determinó asignar un número en forma ascendente, que sería escrito después de la clave y separados (clave y número) por un guion; dependiendo el número mayor de la cantidad de aislados obtenidos por delegación. La anterior descripción corresponde a los aislados plurispóricos, que fueron los primeros aislamientos obtenidos a partir de suelo e insectos.

Delegación	Clave	Nombre científico	Nombre completo
Milpa Alta	Mia-1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> Mia-1

Tabla 6.2. Ejemplo de un nombre hipotético para un aislamiento plurispórico.

6.1.2. Clave para aislamientos monospóricos.

Para los aislamientos monospóricos, que fueron obtenidos a partir de los aislamientos plurispóricos, se acordó designarlos utilizando la nomenclatura ya establecida para los aislamientos plurispóricos, con la salvedad de adicionar, después del dígito, un punto y un decimal, que hacen referencia al número de aislamientos monospóricos obtenidos de cada plurispórico.

Delegación	Clave	Nombre científico	Nombre completo
Milpa Alta	Mia-1.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> Mia-1.1

Tabla 6.3. Ejemplo de un nombre hipotético para un aislamiento monospórico.

6.2. Colecta de suelo e insectos.

Para la colecta de suelo agrícola y forestal e insectos, se realizó un recorrido a cada una de las 7 Delegaciones rurales del D. F., las cuales son: Álvaro Obregón, Cuajimalpa, Magdalena Contreras, Milpa Alta, Tlalpan, Xochimilco y Tláhuac la información recaba se muestra en la tabla 6.4.

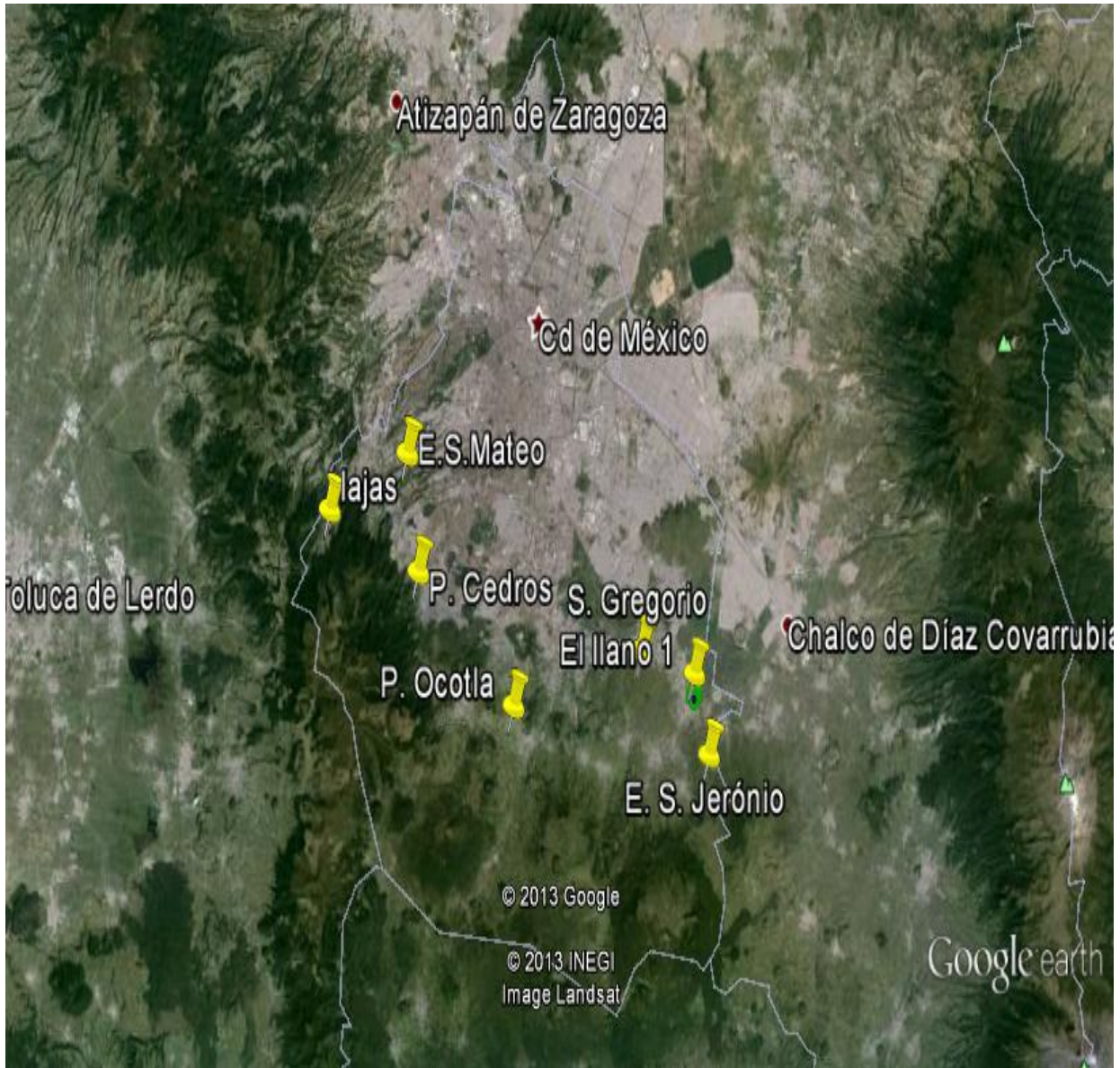


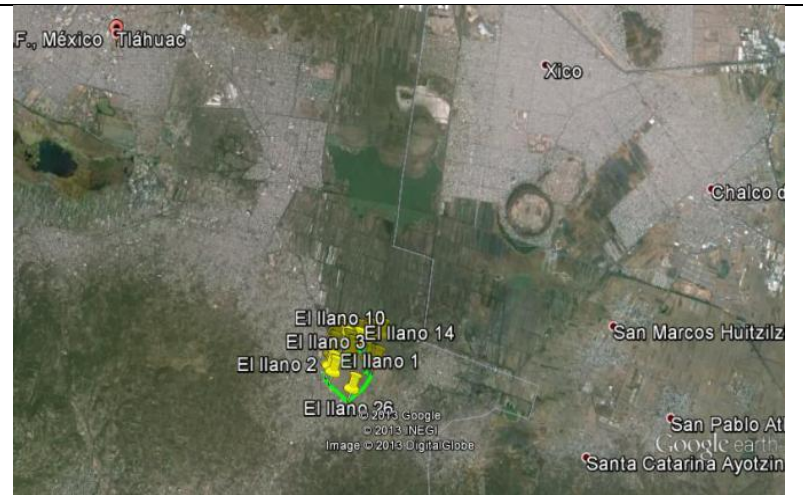


Figura 6.1. Los 7 puntos muestreados del D.F.

En la Delegación Álvaro Obregón la colecta se realizó en cultivo de maíz del ejido de San Mateo. En Cuajimalpa el cultivo de colecta es de frambuesa, se ubica en la calle Lajas, No 51, Col. Pueblo San Lorenzo Acopilco. En la Delegación Magdalena Contreras la colecta fue en zona forestal conocida como paraje los Cedros, Pueblo San Nicolás Totolapan. En Milpa Alta se muestreo en un cultivo de nopal del ejido San Jerónimo. En Tlalpan se colecto en un cultivo de acelga. En Xochimilco se colecto en cultivo de maíz y en Tláhuac se colecto en cultivos de maíz, amaranto y hortalizas.

Fecha de colecta	Coordenadas geográfica			Delegación	Código de muestra	Predio	Propietario	Muestra	Imagen
	Punto	UTM	14Q						
08- octubre- 13	1	2135517	0464934	Cuajimalpa	Cuj	Calle lajas, No 51, Col. Pueblo San Lorenzo Acopilco. Cultivo de frambuesa	Marciala Peñaloza Baltasar	Suelo e insectos	 <p>Georreferencia de Cuajimalpa.</p>
	2	2135544	0464951						
	3	2135521	0464922						
	4	2135554	0464934						
									 <p>Georreferencia del predio las lajas.</p>

9- octubre- 13	1	2125409	0500933	Tláhuac	Tac	El llano	Asociación de comuneros del Llano	Suelo e insectos
	2	2125543	0500859				Tecomitl-	
	3	2125569	0500833				San Juan.	
	4	2125847	0500876				Cultivo:	
	5	2126001	0500913				Maíz,	
	6	2126186	0500958				Hortalizas y	
	7	2126365	0501004				Amaranto	
	8	2126323	0501043					
	9	2126226	0501120					
	10	2126135	0501192					
	11	2126033	0501273					
	12	2125887	0501383					
	13	2126145	0501479					
	14	2126077	0501548					
	15	2126267	0501615					
	16	2126205	0501765					
	17	2126324	0501810					
	18	2126289	0501905					
	19	2126292	0501915					
	20	2126294	0501979					
	21	2126342	0502084					
	22	2126321	0502134					
	23	2125722	0501836					
	24	2125665	0501960					
	25	2125642	0502032					
	26	2125007	0501414					



Georreferencia de Tláhuac.



Georreferencia del predio el Llano.

10- Octubre- 13	1	2120430	0502344	Milpa Alta	Mia	Ejido San Jerónimo	Pedro de la Rosa Martínez	Suelo e insectos	 <p>Georreferencia de Milpa Alta.</p>
	2	2120446	0502346						
	3	2120454	0502365						
	4	2120425	0502363						
									 <p>Georreferencia del ejido San Jerónimo.</p>

13- octubre- 13	1	2139015	0472534	Álvaro Obregón	Alo.	Ejido de San Mateo.	Marcela Martínez Gomes.	Suelo e insectos.
	2	2139045	0472519					
	3	2139022	0472472					
	4	2138985	0472495					

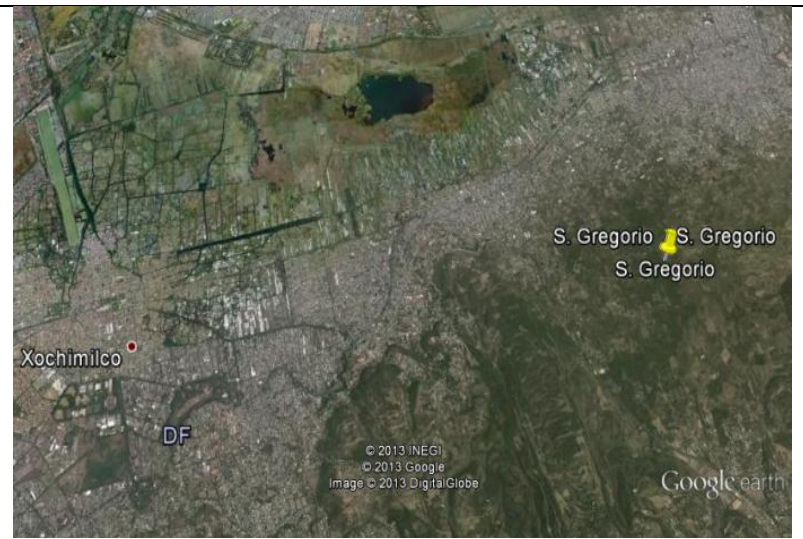


Georreferencia de Álvaro Obregón.



Georreferencia del ejido dan Mateo.



14- octubre- 13	1	2126842	0495702	Xochimilco	Xoch	Ejido de la zona cerril de San Gregorio Atlapulco	Otón Galicia	Suelo e insectos
	2	2126833	0495702					
	3	2126842	0495682					
	4	2126853	0495691					



Georreferencia de Xochimilco.



Georreferencia del ejido San Gregorio Atlapulco)

22- octubre- 13	1	2123494	0482933	Tlalpan	Tap	Predio Ocotla, San Miguel Topilejo	Albino Flores García	Suelo e insectos	 <p>Georreferencia de Tlalpan.</p>
	2	2123464	0482936						 <p>Georreferencia del predio Ocotla</p>
	3	2123451	0482981						
	4	2123452	0482979						

25- octubre- 13	1	2131807	0473677	Magdalena Contreras	Mag	Paraje los Cedros San Nicolás Totolapan	Aurelio Luna Hernández	Suelo e insectos
	2	2131790	0473701					
	3	2131718	0473618					
	4	2131733	0473603					



Georreferencia de Magdalena Contreras.



Georreferencia del paraje los Cedros.

(Zimmerman, 1986; Hernández *et al.*, 2011; Carrillo *et al.*, 2013)

Tabla 6.4. Muestreo y Georreferencia de los 7 recorridos realizados en las delegaciones rurales del D.F. El sistema UTM (Universal Transversa de Mercator) es una referencia Internacional que nos permite ubicar geográficamente un objeto en la Tierra y así conocer su latitud y longitud, la cual está dada en metros. El numero 14 indica a que región de la República Mexicana pertenece esa coordenada relacionado con el Huso. La letra Q está relacionada con la Latitud.

Las primeras 6 zonas de colecta (Álvaro Obregón, Cuajimalpa, Magdalena Contreras, Milpa Alta, Tlalpan, Xochimilco) tienen magnitudes de 3,000 a 8,000 m², la colecta se realizó tomando suelo de perímetro en el interior del cultivo. Excepto en la séptima zona de muestreo (Tláhuac), misma que tiene 105 hectáreas de cultivos; en este caso, el muestreo se realizó en toda la extensión de su perímetro.

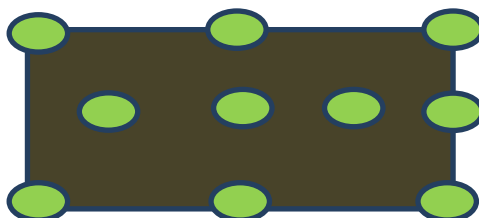


Figura 6.2. Ejemplo de la forma colectada en 6 delegaciones.

En cada uno de los siete predios se colectaron en bolsas de plástico 10 muestras de 1/2 kg aproximadamente, se tomaron con un cucharón de plástico a una profundidad no mayor a 15 cm, se guardaron en hielera (Zimmermann, 1986) y se etiquetaron con los datos de la fecha de colecta, nombre del colector, zona de colecta, Delegación, clave de la Delegación, se registró el cultivo del que se muestreo y el nombre del agricultor. Además, los sitios muestreados fueron ubicados con un Geoposicionador Satelital (Garmin etrex) y todas las muestras de suelo fueron almacenadas en refrigeración a una temperatura de 4°C (Hernández *et al.*, 2011), en el cuarto frío, donde permanecieron hasta su procesamiento.

En tubos estériles falcón, se colectaron insectos vivos con pinzas de disección, incluyendo trozos de hojas del cultivo de donde se tomaron; fueron llevados al laboratorio (Carrillo *et al.*, 2013) W-104 de hongos filamentosos de la UAM-I, donde fueron procesados el mismo día de colecta. Se recabaron los mismos datos de la colecta de suelo.



Figura 6.3. Muestras de suelo e insectos colectados y etiquetados.



Cuajimalpa



Tláhuac



Milpa alta



Álvaro Obregón



Xochimilco



Tlalpan



Magdalena Contreras



Magdalena Contreras

Figura 6.4. Colecta de suelo e insectos en las 7 Delegaciones Rurales del D.F.

6.3. Aislamiento de HE (obtención de aislados plurispóricos)

6.3.1. Aislamiento por el método de trampeo.

Para el aislamiento de Hongos entomopatógenos se utilizaron muestras de suelo de las siete Delegaciones. Las muestras de suelo fueron cernidas con un tamiz del número 10 (CENICAÑA, 2012) y humedecidas, se tomaron submuestras de 60 g y se vertieron en vasos de plástico cristal desechable No 6, se agregaron 5 larvas de *Tenebrio molitor* o *Galleria mellonella* se taparon, cada 24 horas los vasos se giraron 180° para que las larvas estuviesen en mayor contacto con el suelo, en el séptimo día de incubación, las larvas muertas fueron separadas del contenedor de plástico para continuar con el procesamiento. A las larvas con micosis, se les retiró el exceso de suelo con un pincel, después se sumergieron un minuto en una solución de alcohol al 70 %, después 5 minutos en solución de Hipoclorito de sodio al 1 %, y finalmente 3 lavados en agua destilada estéril de 5 minutos cada uno (Carrillo *et al*, 2013). Las larvas se colocaron sobre papel filtro estéril a fin de remover el exceso de humedad, se colocan en cámara húmeda e incubaron a 28 ° C y en fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) las larvas fueron retiradas de la cámara húmeda y se eligieron las que presentaban signos de micosis por HE, se sembró un corte transversal de las larvas infectadas en el centro de placas de agar (cajas Petri) con medio de cultivo SDA (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli) (Carrillo *et al*, 2013; Zimmermann, 1986), fue preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante (a una concentración de 65 g/L).

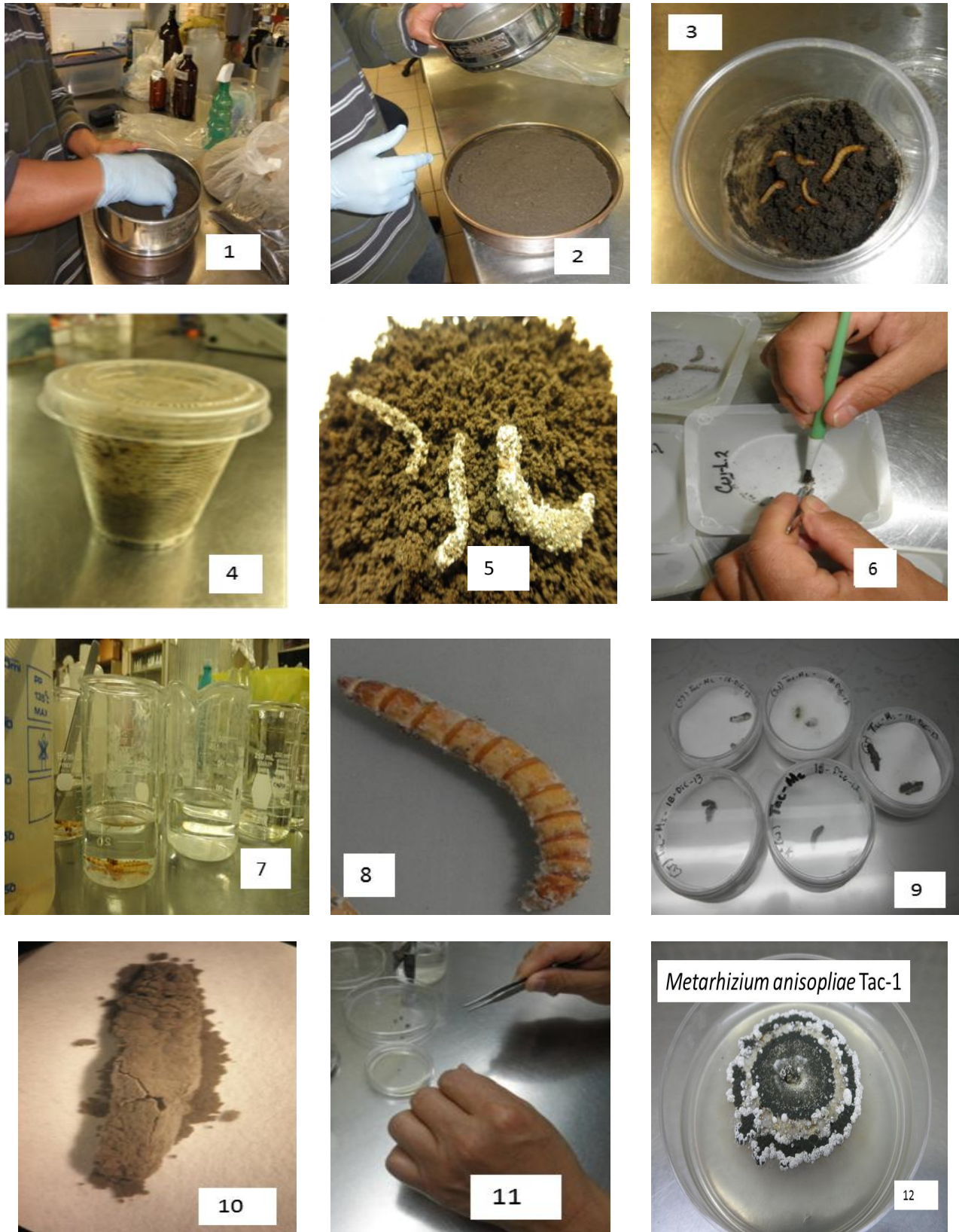


Figura 6.5. Proceso del trampeo para obtener aislamientos plurispóricos (pasos del 1 al 12).

6.3.2. Aislamiento por el método de alícuota.

En tubos Eppendorf con 1 mL de agua destilada esterilizada y 0.35 g de suelo de las 7 zonas colectadas, se prepararon alícuotas, se agitaron en vortex durante 30 s. Los tubos se prepararon por cuadruplicado para cada delegación. En condiciones de esterilidad se sembraron 50 μ L de alícuotas en placas con medio de cultivo selectivo para *Metarhizium* (SM) y medio de cultivo selectivo para *Beauveria* (BSM). Los medios de cultivo fueron elaborados con ADS (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Itzcalli). Cuando el medio de cultivo estaba a una temperatura de 60° C, se le agregó 0.05 g/ml de tetraciclina y 0.05 % de desoxicolato de sodio (Sigma Aldrich) para preparar medio BSM, y para preparar medio SM, al ADS (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Itzcalli) se le agregó 500 μ L de cloranfenicol y 0.05 % de desoxicolato de sodio (Sigma Aldrich) (Meyling, 2007).

6.3.3. Aislamiento a partir de insectos colectados.

Los insectos colectados fueron procesados el mismo día de colecta. Se retiraron de los tubos y se colocaron en cámara húmeda, después de 14 días los insectos muertos con signos de micosis, presuntamente por un HE, fueron procesados de la siguiente forma: se limpiaron con un pincel, se desinfectaron en solución de alcohol al 70 % por 1 minuto, después un lavado de 5 minutos en solución de Hipoclorito de sodio al 1 %, y finalmente 3 lavados en agua destilada estéril de 5 minutos cada uno, se colocaron sobre papel filtro estéril a fin de remover el exceso de humedad para colocarlo en cámara húmeda e incubar e 28 ° C y con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar), se tomó una asada del micelio que creció sobre la superficie externa del cuerpo del insecto y se inoculó en cajas de Petri con medio de cultivo SDA (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Itzcalli) (Carrillo *et al*, 2013; Zimmermann, 1986).



Figura 6.6. Aislamiento de HE a partir de insecto.

6.4. Cultivo monospórico.

El cultivo monospórico se elaboró en un medio de cultivo agar-agua (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Itzcalli) al 1.5 % con agar bacteriológico y una solución de Tween 80 al 0.03 % (AMRESCO®) esterilizado en autoclave a una presión de 15 lb/in² durante 15 minutos. De un aislado con 15 días, se tomó una cantidad no determinada de conidios y se colocaron dentro de un frasco vial con 15 mL de Tween 80 al 0.03% (AMRESCO®), de esta suspensión se tomaron alícuotas de 100 µL y se sembró por césped en cajas de Petri con agar-agua (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Itzcalli) al 1.5% e incubó 24 h a 28° C con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Se observó al microscopio para comprobar la germinación de los conidios y en condiciones estériles se tomó un conidio germinado para sembrarlo en una placa de ADS (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Itzcalli) y se incubo a la misma temperatura y fotoperiodo ya mencionados. (Carrillo *et al*, 2013). De cada aislado plurispórico se obtuvo un aislado monospórico.

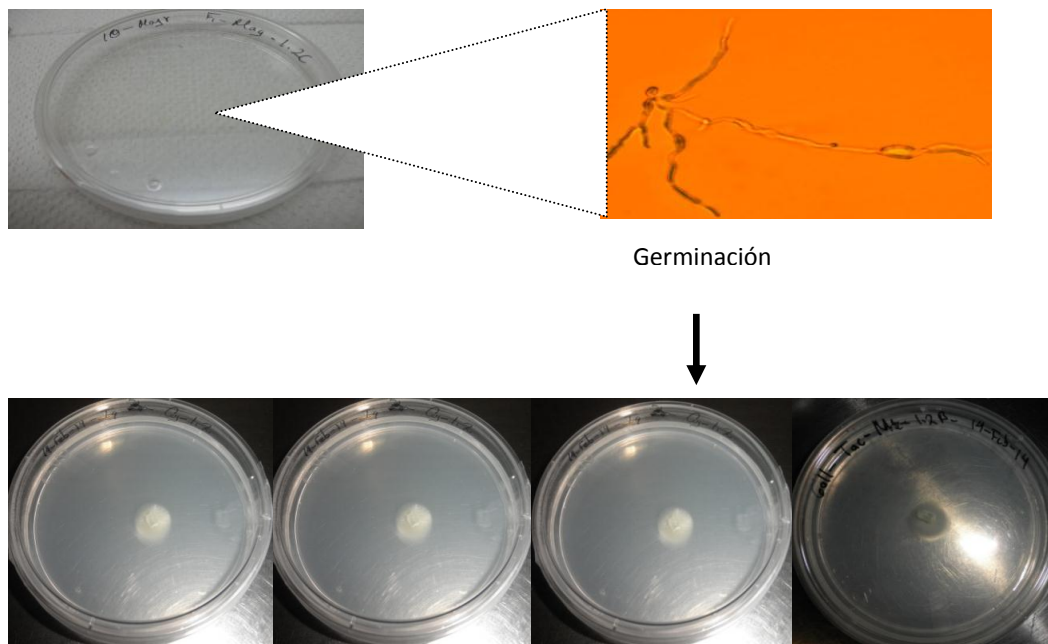


Figura 6.7. Proceso de obtención del cultivo monospórico

6.5. Identificación morfológica.

La identificación morfológica se realizó a través de lecturas microscópicas en preparaciones elaboradas con muestras de cada una de las aislados monospóricos. Las muestras se prepararon inoculando 100 µL de una suspensión de conidios en agar-agua (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Itzcalli) al 1.5% y se incubó a 28° C con fotoperiodo de 12 h luz y

12 h oscuridad; el cultivo se extendió por 7 días, su crecimiento se frenó con unas gotas de azul lactofenol (HYCEL DE MÉXICO S. A. de C.V.). Se cortó un fragmento de cultivo y se realizaron montajes en portaobjetos, donde se observaron las estructuras reproductoras de los aislados. La identificación morfológica de los aislados se realizó a partir de observaciones con microscopio (OLYMPUS BX50) y con el programa Image-Pro plus 6.3 se tomaron las imágenes y medidas de las estructuras reproductoras para cada aislado; al menos 30 mediciones de conidióforo, fialides y conidios de cada aislado se obtuvieron. La identificación morfológica se realizó con base en las claves de Humber (2012).



Figura 6.8. Montajes y equipo de microscopía para realizar la identificación morfológica.

6.6. Identificación molecular.

6.6.1. Obtención del micelio fúngico.

En condiciones de esterilidad se inoculó con asa microbiológica conidios de los aislados en 50 mL de medio líquido de cultivo, previamente elaborado con 10 g/L de peptona (BPBioxon ® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Izcalli) y 20 g/L de glucosa (REASOL MR) y esterilizado a una presión de 15 lb/in²; el cultivo se incubó a 28° C con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad por 6 días (Carrillo *et al*, 2013).



Figura 6.9. Cultivo del micelio fúngico de los aislados para su identificación

6.6.2. Extracción del ADN.

La extracción del ADN se realizó siguiendo el protocolo-Promega del kit de purificación comercial Wizard®. Aproximadamente 2 g de micelio cultivado fue macerado en un mortero con un volumen adecuado de nitrógeno líquido; una pequeña porción de micelio pulverizado fue vertido en un tubo Eppendorf (estéril) de 2 ml y se siguieron las instrucciones del kit de extracción. El DNA fue almacenado a -80°C



Figura 6.10. Extracción del AND con el kit de Promega de purificación comercial Wizard®.

6.6.3. Electroforesis en gel de agarosa.

Para comprobar la calidad e integridad del ADN obtenido se realizó electroforesis en gel de agarosa. El gel se elaboró con 0.5 g de agarosa (marca Mercury) diluidos en 40 mL de solución TAE 1X y 0.2 µL de rojo de Texas. Para cada muestra se colocaron 6 µl de agua destilada desionizada, 1 µl de buffer de carga y 1 µl de muestra ADN. El corrimiento electroforético se realizó a 85 Volts por 55 minutos. La imagen del gel fue tomada en un fotodocumentador de microscopia fluorescente, modelo 2200 pro, de la marca Carestream.

6.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción de PCR se realizó con el kit master mix HotStar Taq® (QUIAGEN), se preparó en un tubo Eppendorf de 200 µL a un volumen total de 25 µL. Las cantidades de cada reactivo y el orden en que se mezclaron fueron: 12.5 µL polimerasa Master mix, 1.5 µL de cada primer que amplificaran los espacios transcritos internos (ITS) (forward 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' y reverse 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 10 µL de agua libre de RNAsas (QUIAGEN) y 1 µL de ADN de cada aislado. Las condiciones de reacción fueron 95° C por 5 minutos, 94° C por 1 minuto, 48° C por 45 s, 72° C por 1 minuto, realizando 35 ciclos y finalmente la extensión a 72° C por 10 minutos. Como control negativo se utilizó la misma cantidad de primers, de Master mix y de agua destilada desionizada pero sin ADN. La imagen del gel fue tomada en un fotodocumentador de microscopia fluorescente, modelo 2200 pro, de la marca Carestream.

6.6.5. Electroforesis de PCR en gel de agarosa.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se elaboró un gel de agarosa para PCR con 0.5 g de agarosa (marca Mercury) en 50 mL de solución TAE 1X y 0.2 µL de rojo de Texas. Se mezclaron 1 µL de buffer de carga y 2 µL de la reacción de PCR de cada muestra y se depositaron en el gel. El gel se corrió a 85 Volts por 55 minutos. La foto del gel de PCR fue tomada con el mismo fotodocumentador ya mencionado.

6.6.6. Purificación, secuenciación e identificación de los aislados.

Corroborada la aparición de las bandas (producto de PCR) en el gel, la mezcla de reacción de PCR de cada aislado (incluyendo el control), fueron purificadas en gel de sephadex (GE Healthcarre) y finalmente enviadas a secuenciación al Laboratorio Divisional de Biología Molecular (LDBM) de la Dirección de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS) de la UAM-I. El secuenciador empleado fue un Applied Biosystems, modelo Abi Prism 3130 XL (Hitachi). Las secuencias de los primers amplificadas fueron comparadas en la base de datos de HE del programa informático de alineamiento de secuencias (BLAST) del *National Centre for Biological Sciences* (NCBS).

Para comprobar que la extracción de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de todas las cepas silvestres se realizó correctamente, se decidió utilizar durante el procesamiento de las muestras de la identificación molecular, al HE *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotae* CP-Oax como control positivo, que es parte de la colección de HE del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo Texcoco.

6.7. Preservación de los aislamientos.

Con la finalidad de determinar la sobrevivencia de los conidios a través del tiempo de las cepas monospóricas de *Metarhizium robertsii* Xoch-6.1, *Metarhizium* sp Xoch-3.1, *Metarhizium* sp Mag-1.1, *Metarhizium* sp Xoch-4.1, *Metarhizium* sp Cuj-3.1 y *Metarhizium* sp Mia-4.1, el porcentaje de viabilidad fue evaluado después de 5 meses.

Una colonia de 14 días de cada cultivo fue seccionada en trozos de 5 mm de diámetro con un sacabocados y en condiciones de esterilidad fueron preservados por 2 métodos: a) Criopreservación. Se colaron 3 segmentos de 5mm de diámetro en crio-viales (CORNING ®) de 2 mL de volumen, se les agrego 1.8 mL de una solución de glicerol al 10 % y las muestras se criopreservaron a -80° C. b) Refrigeración, a los crio-viales con 3 segmentos de cultivo se le agrego 1.8 mL de agua destilada estéril y se guardaron en refrigeración a 4° C (López-Lastra *et al.*, 2002; Carrillo *et al*, 2013; Montesinos-Matías, 2008). Para cada cepa fueron almacenados 10 crio-viales.

Cada mes fue retirado un crio-vial de ambos tratamientos de cada cepa para medir su viabilidad, a partir del que se elaboró una suspensión de conidios de 1×10^4 con/mL e inoculando 30 μ L (aproximadamente 300 conidios) en placas de Agar Maltosa Sabouruad (AMS), la composición del cultivo es la siguiente en g/L: Maltosa 20, Peptona de carne 2.5, Peptona de caseína 2.5, Agar Bacteriológico 15 y Extracto de levadura 0.5 (todos de la marca BPBioxon ® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli) y adicionado con Desoxicolato de sodio a 0.5 g/L (Sigma-Aldrich), con cuatro repeticiones, los cultivos fueron incubados a 28° C con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, una caja con SDA sin sembrar fue colocada como control. La viabilidad se reportó como unidades formadoras de colonias (UFC) (García-Ortiz, 2012; Ángel-Cuapio, 2011), a diferencia de los autores, en este trabajo, las colonias formadas se contaron a las 48 horas. En el día del inicio de la preservación, también se midió la viabilidad de cada cepa.



Figura 6.11. Preservación de 7 cepas aisladas del D.F.

6.8. Envío de muestras al Centro Nacional de referencia de Control Biológico (CNRCB)

Se prepararon cultivos plurispóricos y monospóricos por duplicado de todos los aislados obtenidos en agar SDA en (BPBioxon ® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Izcalli) tubo inclinado; en total, 108 tubos se enviaron al CNRCB para el registro, resguardo aprovechamiento, investigación y conservación de los HE silvestres endémicos del D.F. Los certificados de depósito se muestran en el anexo número 3.



Figura 6.12. Muestras de las cepas aisladas para su envío y depósito en el CNRCB.

6.9. Producción de conidios en sustrato sólido (arroz).

A partir de este punto, se trabajó exclusivamente con los cultivos monospóricos de *Metarhizium* sp. Xoch-8.1, *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1, *Metarhizium* sp. Cuj-2.1 y el aislado plurispórico *Beauveria bassiana* Tac-1. Se realizaron 2 experimentos, en el primero se comparó entre los 4 aislados la producción de conidios en arroz y las pruebas de calidad (germinación, estrés osmótico, termotolerancia y bioensayo) de cada aislado; en un segundo experimento fue incluido la cepa comercial Metasin® *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 de la empresa Agrobionsa, con quien fue comparado los mismos parámetros; la cepa ABNMa201 fue aislada sembrándola por estría cruzada en caja de Petri con ADS (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli), posteriormente se resembró un cultivo monoclonia siguiendo la técnica de Ángel-Cuapio, (2011) y se realizó su identificación morfológica siguiendo la metodología del apartado 6.5.

6.9.1. Preparación del inóculo.

Se inocularon las cepas en matraz Elenmeyer de 250 mL de capacidad, con medio de cultivo ADS (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli) e incubaron a 28° C con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, durante 7 días (Ángel-Cuapio, 2011).



Figura 6.13. Inóculo de 7 días de cultivo para resiembra en arroz.

6.9.2. Producción de conidios en arroz.

Se realizaron cinéticas de producción de conidios por triplicado para cada cepa de 7 y 10 días de cultivo, utilizando botellas serológicas con 10 g de arroz precosido (Valle Verde®) esterilizado e inoculado con una suspensión de conidios de 1×10^7 con/mL, elaborada con el inóculo cultivado por

7 días en ADS (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán Izcalli); se agregó 5.05mL de agua estéril y se homogenizó el inóculo con el arroz pre-cosido, se incubó a 28° C con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. En el día 7 y 10 de cultivo fueron cosechados los conidios transfiriendo a un vaso de precipitados el cultivo y se adicionaron 60 mL de Tween 80 al 0.05% (AMRESCO®), se agitó durante 10 minutos en una parrilla magnética (Barnstead International), se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer para determinar el rendimiento de conidios. La producción de conidios se reporta como conidios por gramo de sustrato sólido inicial (con/gssi) (Ángel-Cuapio, 2011).



Figura 6.14. Cultivo de las 4 cepas aisladas en arroz y la cepa comercial ABNMa201.

6.10. Pruebas de calidad.

6.10.1. Germinación.

A partir de conidios cosechados por 10 días de cultivo en arroz de las 4 cepas, se elaboró una suspensión de conidios de 1×10^7 con/mL con la cual, se sembraron 50 μ L en placas de SDA (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli) por césped (distribuyendo sobre el agar con varilla de vidrio el inóculo) con 2 repeticiones. Se contaron al menos 3 sectores de la caja donde se podía contar conidios germinados a las 15 h de incubados los cultivos a 28° C y con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad; se colocó una caja con medio SDA (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli) sin inóculo como control. Los conidios se consideraron germinados cuando la longitud del tubo de germinación fue mayor que el doble del diámetro de los conidios (Miranda Hernández *et al.*, 2014).

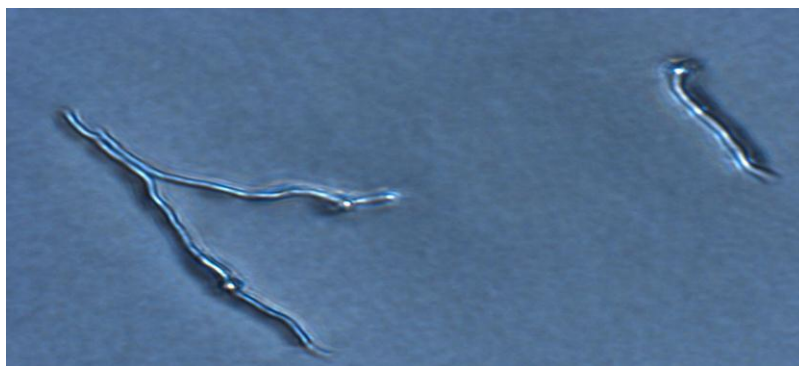


Figura 6.15. Germinación de conidios de aislados del género *Metarhizium*.

6.10.2. Germinación en condiciones de hiperosmoralidad (Estrés osmótico).

Se evaluó la resistencia de las 4 cepas en 2 concentraciones diferentes de sal. A través de inocular 30 μL de una suspensión de conidios de 1×10^4 con/mL en placas de SDA (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli) a concentración de 0.3 M y 0.5 M, la suspensión fue elaborada con conidios cosechados en arroz (día 10). La siembra fue en condiciones de esterilidad e incubada a 28° C con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, con 5 repeticiones y se colocó una caja con medio SDA (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli) sin inóculo como control; la viabilidad se reportó como unidades formadoras de colonias (UFC) (Miranda Hernández *et al.*, 2014). A las 48 horas de cultivo fueron contadas las colonias formadas.

6.10.3. Termotolerancia.

A partir de los conidios cosechados en arroz para cada una de las cuatro cepas, se preparó una suspensión de conidios de 1×10^4 con/mL, entonces 1 mL de esta suspensiones fue colocado en tubos de vidrio y sometidos en baño de agua a una temperatura de 45° C a distintos tiempos (tratamientos), 0 h (como control), 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h y 3 h, con 5 repeticiones para cada tratamiento, enseguida los tubos fueron agitadas en un bortex (Scientific Industries, New York, NY) y 30 μL fueron inoculados (300 conidios) en placas de SDA (BPBioxon® Becton Dicknson de México S. A. de C. V. Cuautitlán itzcalli) y esparcidos con una varilla de vidrio sobre la superficie del medio de cultivo, se incubó a 28 ° C con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Una caja con medio SDA se colocó sin inóculo como control. El porcentaje de viabilidad de los tratamientos fue comparada con el del control y la información experimental fue ajustada al modelo de decaimiento exponencial (Miranda Hernández *et al.*, 2014), Las unidades formadoras de colonias fueron contadas 48 h después.

6.10.4. Bioensayos.

Se cosecharon conidios del día 10 de cultivo de las 4 cepas y se preparó 20 mL de una suspensión de conidios 1×10^8 con/mL. En ella fueron sumergidos durante 15 segundos larvas de *Tenebrio molitor*, usando como unidad experimental una caja de Petri con 10 larvas y 5 repeticiones por cepa (5 unidades) y una unidad experimental como control, estas larvas fueron sumergidas 15 segundos en una solución de Tween 80 al 0.03 % (AMRESCO®) estéril. Todas las unidades experimentales fueron colocadas dentro de cámara húmeda e incubada a 28 ° C con fotoperiodo de 12 h luz y h oscuridad; el bioensayo se dejó correr por 14 días, las larvas fueron revisadas a partir del tercer día y después a diario hasta el término. Las larvas muertas fueron transferidas a otra cámara húmeda para estimular el crecimiento fúngico, si es que la larva había muerto por un HE (Montesinos-Matías *et al.*, 2011). La información del bioensayo se ajustaría al modelo de decaimiento exponencial $Y = (100 - S) e^{-k(t-t_0)} + S$; donde

$Y = 100$; si $0 \leq t \leq t_0$ donde:

Y es el porcentaje de sobrevivencia al tiempo t .

k es la velocidad de muerte específica (días^{-1}).

t_0 es el tiempo de retraso en que ocurre la primera muerte (días).

S es el porcentaje de sobrevivencia estimado (%).

A reserva, de que el porcentaje de muerte de los bioensayos alcance en al menos dos cepas el 60%.

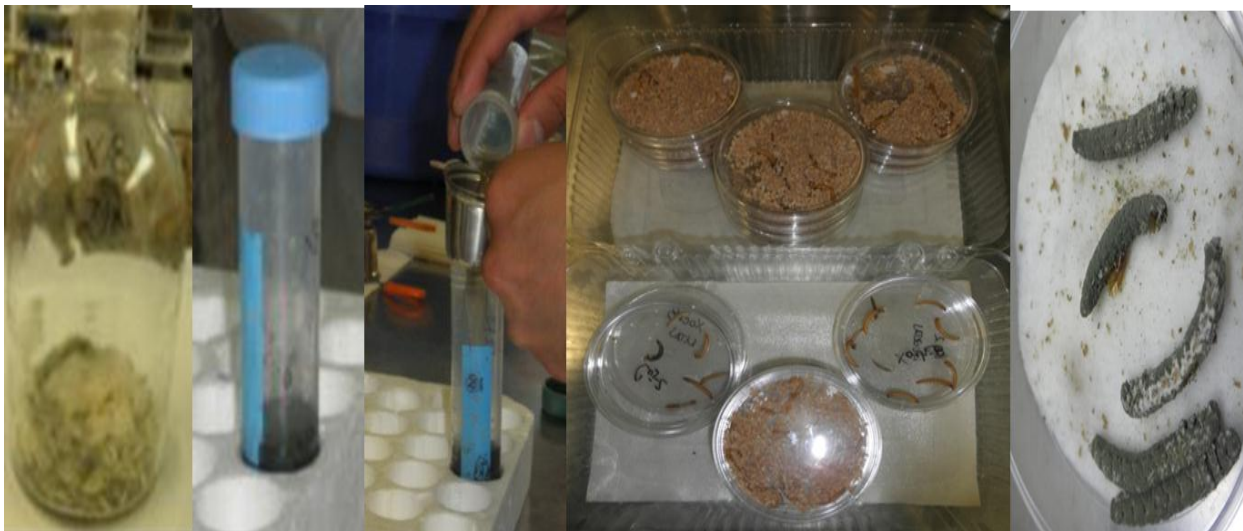


Figura 6.16. Realización del bioensayo con los conidios cultivados en arroz de las 4 cepas aisladas y la cepa comercial ABNMa201.

6.11. Caracterización del suelo.

La caracterización del suelo se realizó en las muestras de las que solamente se pudo aislar HE (Milpa Alta, Tláhuac, Magdalena Contreras, Cuajimalpa y Xochimilco), misma que se fue elaborada en el Laboratorio de Física de Suelos del Edificio de Edafología del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Texcoco.

6.12. Análisis estadístico.

La prueba de germinación fue reportada como porcentaje de germinación. Para la información de preservación de 7 cepas, estrés osmótico y producción de conidios en arroz, se realizó una ANOVA de una vía y una prueba de comparación de medias de Tuckey (alpha 0.05). En el caso de la cepa *B. bassiana* para la producción de conidios se realizó una prueba de comparación de medias de t Student (alpha 0.05), el programa estadístico utilizado fue el SPSS y los datos de termotolerancia fueron ajustados al modelo de decaimiento exponencial.

7. Resultados y discusión.

7.1. Aislamiento de Hongos entomopatógenos de suelo e insectos.

Del suelo colectado de las siete Delegaciones Rurales del D.F., se aislaron 25 cepas de HE de suelo de 5 Delegaciones y una cepa aislada de insecto, dando un total de 26 cepas aisladas. La distribución de cepas aisladas por Delegación es mostrada en la tabla 7.1.

Delegación	Localidad	Coordenadas geográficas		Cultivo	No. de aislados por localidad	
		UTM	14Q		<i>Beauveria</i>	<i>Metarhizium</i>
Álvaro Obregón	San Mateo	2139015	0472534	Maíz	0	0
Cuajimalpa	San Lorenzo Acopilco	2135517	0464934	Frambuesa	0	5
Magdalena Contreras	San Nicolás Totolapan	2131807	1473677	Fresa	0	1
Milpa Alta	San Jerónimo Miacatla	2120430	0502344	Nopal	0	4
Tláhuac	San Juan Ixtayopan	2125409	0500933	Maíz y amaranto	1	6
Tlalpan	San Miguel Topilejo	2123494	0482933	Acelgas	0	0
Xochimilco	San Gregorio Atlapulco	2126842	0495702	Maíz	0	9

Tabla 7.1. Localización geográfica y política de las zonas elegidas para el aislamiento de hongos entomopatógenos. Se muestra también el tipo de cultivo de cada campo agrícola y forestal del D.F.

Los HE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* tienen una distribución mundial (Bidochka *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 2003; Meyling y Eilenberg, 2006; Meyling *et al.*, 2009), siendo géneros de HE que fueron aislados en éste trabajo. Keller *et al.*, (2003) analizaron 82 suelos distintos, logrando aislar *Metarhizium anisopliae* de 79, *Beauveria bassiana* en 2; encontraron que el 96% de los suelos analizados contenían HE. En el trabajo realizado por Bidochka *et al.*, (1998) encontraron HE en 78 (91%) de 86 localidades muestreadas; *Beauveria bassiana* fue detectada en 61.2% de los sitios muestreados, *Metarhizium anisopliae* en 66.7% y 10% para *Isaria fumosorosea*; siendo aislado *Metarhizium anisopliae* en mayor cantidad de suelos agrícolas que en forestales (suelos naturales), para *Beauveria bassiana* los aislamientos fueron mayores en suelos forestales y en menor cantidad de suelos agrícolas. En éste trabajo no se pudo aislar *Beauveria bassiana* de suelos forestales (Delegaciones Magdalena Contreras y Cuajimalpa), sólo de insecto colectado en zona agrícola. En esta investigación encontramos mayor presencia de *Metarhizium anisopliae* en suelos agrícolas (Bidochka *et al.*, 1998). Meyling y Eilenberg (2007) denominan a *Metarhizium anisopliae* como una especie “agrícola”, ya que ha sido muy frecuentemente aislado de ambientes de suelos expuestos y perturbadas.

Las muestras de suelo analizadas en este trabajo fueron 27 de 7 suelos distintos; de ellas en el 81.5% se lograron aislar HE y en cinco de muestras, no fue posible aislar HE (3 de la Delegación Álvaro Obregón y 2 de la Delegación Tlalpan). Los géneros a los que pertenecen los HE aislados son: *Metarhizium* y *Beauveria*, del primero se obtuvieron 25 y del segundo uno (de insecto). La riqueza en la distribución de los aislados se da en la Delegación Xochimilco con 9 del género *Metarhizium*, obtenidos de suelo franco (Tabla 7.2) volcánico cultivado con maíz y en orden descendente; de suelo franco no volcánico de la Delegación Tláhuac se aislaron 7 cepas, 6 del género *Metarhizium* de un cultivo de maíz y una cepa del género *Beauveria* de un cultivo de amaranto; de suelo franco (volcánico) de la Delegación Cuajimalpa se obtuvieron 5 cepas del género *Metarhizium* de un cultivo de frambuesa inmerso en área forestal; en el caso de la Delegación Milpa Alta, se aislaron 4 cepas del género *Metarhizium* de suelo franco arcilloso arenoso volcánico de cultivo de nopal y la menor cantidad se obtuvo del suelo franco arcilloso de la Delegación Magdalena Contreras, aislándose una cepa del género *Metarhizium* de cultivo de fresa dentro de zona forestal (suelo volcánico). A pesar que, el suelo colectado de las Delegaciones Magdalena Contreras y Cuajimalpa pertenecen a cultivos agrícolas, tienen origen forestal (los cultivos se encuentran dentro zonas forestales); con clima, suelo y altura diferentes entre ambos. Los restantes 3 sitios de colecta (Milpa Alta, Tláhuac y Xochimilco), son zonas agrícolas y también, con clima, suelo y altura distintos entre ellas.

Clave	Clase textural
R	Arcilloso
RI	Arcillosos limosos
Ra	Arcillo arenosos
Cr	Franco arcilloso
CrI	Franco arcillo limosa
Cra	Franco arcillo arenosa
C	Franco
FI	Franco limosa
L	Limosa
Ca	Franco arenosas
Ac	Areno francosa
A	Arenosa

Tabla 7.2. Clasificación de las clases texturales de suelo (de la Federación, D. O. 2002).

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4	< 0.5
Bajo	4.1 – 6.0	0.6 – 1.5
Medio	6.1 – 10.9	1.6 – 3.5
Alto	11.0 – 16.0	3.6 – 6.0
Muy alto	> 16.1	> 6

Tabla 7.3. Valores de referencia para clasificar la concentración de materia orgánica en suelos (de la Federación, D. O. 2002).

Independientemente de la ubicación geográfica, elevados porcentajes de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* fueron aislados de suelos de textura arcillosa, con pH ácido, alto contenido de materia orgánica y la ausencia de ambas especies fue determinada por suelos arenosos alcalinos con bajo contenido de materia orgánica (Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Otras fuentes reportan grandes cantidades de aislamientos de HE de suelos (no mencionan la textura de suelo) con alta cantidad de materia orgánica (Meyling y Eilenberg, 2007). Los resultados obtenidos en éste trabajo muestran que, el 96% de los aislados fueron obtenidos de suelo de textura franco y con contenido de materia orgánica (Tabla 7.3): mediano en las Delegaciones Tláhuac y Cuajimalpa, bajo para Milpa Alta y muy bajo en la Delegación Xochimilco que, es donde se registró la mayor cantidad de

aislamientos. El porcentaje restante de aislamiento se obtuvieron en suelos: franco arcilloso arenoso (Milpa Alta) de contenido de materia orgánica bajo y en franco arcilloso (Magdalena Contreras) de contenido medio de materia orgánica y en general, el pH para todos los suelos fue ácido Tabla (7.4). Los resultados de esta investigación, difieren con los reportados con por trabajos ya citados; el único parámetro que puede asociarse a la ocurrencia de HE, es el pH. Sin embargo, de acuerdo con Pérez-González *et al.*, (2014) las propiedades físicas y químicas (clase de textura del suelo, materia orgánica y pH) del suelo no tienen efecto en la ocurrencia de HE.

Delegación	Materia orgánica (%)	Clase	Textura	pH	No de aislados
Tláhuac	1.72	Medio	Franco	6.83	7
Xochimilco	2.91	Muy bajo	Franco	5.87	9
Milpa Alta	5.69	Bajo	Franco arcilloso arenoso	6.455	4
Cuajimalpa	6.35	Medio	Franco	5.615	5
Magdalena Contreras	6.35	Medio	Franco arcilloso	5.71	1

Tabla 7.4. Propiedades físicas y químicas del suelo a partir de donde se obtuvieron los HE.

Las comunidades de HE aislados de suelos agrícolas (suelos perturbados), son diferentes de los que pertenece a comunidades poco perturbadas (forestales) (Bidochka *et al.*, 1998; Meyling y Eilenberg, 2006). El grupo de aislados de *Metarhizium* de suelo agrícola pertenecen a un grupo genético específico diferente de los aislados de suelo forestal, siendo 2 especies crípticas separadas (Bidochka *et al.*, 2001). De esta forma, los aislados obtenidos en este trabajo del género *Metarhizium*, es muy probable que correspondan a 2 tipos: forestal (Delegaciones Cuajimalpa y Magdalena Contreras) y agrícola (Xochimilco, Tláhuac y Milpa Alta), coincidiendo éstos resultados con los obtenidos por (Bidochka *et al.*, 1998), quienes aislaron cepas del género *Metarhizium* en mayor cantidad de suelo agrícola y en menor proporción de áreas forestales, como en nuestro caso. Este fenómeno ha sido observado en varias partes del mundo en agroecosistemas de clima templado, además que, distintos grupos genéticos de HE coexisten a escala local dentro de un mismo agroecosistema y demostrándose que un hábitat en particular, puede albergar diferentes especies de HE, así como también, diferentes grupos genéticos de HE (Meyling y Eilenberg, 2007).

Los factores que influyen la preferencia de los HE por el hábitat local, no han sido determinados (Bidochka *et al.*, 1998). La enorme cantidad de diversidad genética de estos hongos y su potencial adaptativo a varios hospedantes, conidiación y habilidad saprofítica puede influenciar profundamente los resultados de aislamiento de estos hongos, a partir de suelo. Pero se sugiere que *Beauveria Bassiana* requiere infectar en serie a hospedantes para sobrevivir y la ausencia de

ellos en suelos agrícolas representa una desventaja (Bidochka *et al.*, 1998). Lo anterior podría explicar porque sólo se aisló una cepa de *B. bassiana* (de insecto) en contraste con los aislados 25 cepas aislados de *M. anisopliae*, ya que, *M. anisopliae* es capaz de conidiar por largos periodos de tiempo y sobrevivir extensos periodos en el suelo en ausencia de un hospedante secundario, incrementando su presencia mejor que *B. bassiana*. Hay múltiples factores que pueden influenciar la sobrevivencia de los HE en suelo (Bidochka *et al.*, 1998). La tendencia general es que, *M. anisopliae* puede sobrevivir largos periodos de tiempo en el suelo, mientras que *B. bassiana* es sensible a la competencia de las poblaciones microbianas existentes en el suelo (Bidochka *et al.*, 1998). *Beauveria bassiana* tiene asociación endofítica con vegetales (tallos y hojas), y por tanto, ha sido aislada más frecuentemente de varias plantas: maíz, cacao, amapola, tomate y de vegetación secundaria (arbustos y plantas silvestres) de regiones templadas. *Metarhizium anisopliae* presenta asociaciones en la rizósfera de los vegetales, lo que le permite sobrevivir fuera del hospedante y permanecer durante largos periodos de tiempo (Meyling y Eilenberg, 2007). Las condiciones abióticas del hábitat, seleccionan al grupo genético de *Metarhizium anisopliae* que puede sobrevivir en un hábitat dado (Bidochka *et al.*, 2001). De esta forma, los HE que en este trabajo se lograron aislar de cada una de las distintas Delegaciones, podrían ser cepas distintas, ya que, provienen de diferentes climas y suelos. Siendo el presente trabajo, el primer reporte sobre aislamiento de HE silvestres de las zonas agrícolas y forestales del D.F. que se registra. Las imágenes de los 26 aislados plurispóricos se muestran en el anexo A.

7.2. Cultivo monospórico.

El cultivo monospórico se realizó con base a lo reportado por Carrillo *et al.*, (2013). Las imágenes de los 26 aislados monospóricos se muestran en el anexo B.

7.3. Identificación morfológica.

La identificación morfológica de los aislados fue realizada con base en las claves de Humber (2012) y de acuerdo con él, las características morfológicas para el género *Metarhizium* son: conidióforos densamente entrelazados, conidios ovoides de color verde, formados en cadenas paralelas largas o cortas adheribles, originan columnas prismáticas o placas continuas (parénquima en empalizada). Los conidióforos son muy ramificados (fiálides), con forma de candelabro y extremadamente entrelazados. De acuerdo con Humber, (2012), Las medidas de conidios son clasificadas en tres rangos: conidios $\leq 9 \mu\text{m}$ corresponde a *Metarhizium anisopliae*; conidios $\geq 11 \mu\text{m}$ pertenecen a *Metarhizium majus* y entre 7 y 11 μm es *Metarhizium acridum*. El género *Beauveria* es descrito por Humber, (2012), formando una densa capa blanca algodonosa sobre el exoesqueleto del hospedante, desarrollando fascículos erectos de hifas, células conidiógenas (conidióforo)

densamente agrupados (verticilado o solitario), blanco en forma de botella y conidios globosos $\leq 3.5 \mu\text{m}$.

Las características morfológicas de 25 aislados observadas en microscopio, corresponden con la descripción característica y realizada por Humber, (2012), para el género *Metarhizium*. La estructura reproductora (conidióforo) en forma de candelabro densamente entrelazado y formando áreas fértiles productoras de columnas de conidios, son apreciables en el anexo C, donde también se muestran fotografías de estructuras reproductora típicas del aislado número 26, que corresponde con las características del género *Beauveria*, también descritas por Humber (2012).

Los valores promedio de las estructuras reproductoras (conidióforo, fiálides y esporas) de los 26 aislados, se muestran en la tabla 7.5. Las medidas promedio de los conidios del género *Metarhizium* y *Beauveria* corresponden con los descritos por Humber, (2012) y las de *Beauveria* son muy cercanos a los reportados por Pérez-González *et al.*, (2014). Los valores promedio de conidióforo y fialides para el género *Metarhizium*, coinciden con los reportados por Bischoff *et al.*, (2009).

7.4. Identificación molecular.

Con base en el soporte que proporciona el análisis de las secuencias de los ITS ribosomales (Bischoff *et al.*, 2009), fue confirmada por biología molecular la autenticidad de los 26 aislamientos (identificados previamente por la vía morfológica), como organismos entomopatógenos. En algunas cepas, fue posible llegar hasta especie, en otras, la identificación molecular solo ayudo a confirmar la cepa como microorganismo entomopatógeno y quedándose hasta género, como *Metarhizium* sp. La cepa de HE *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotae* CP-Oax incluida en el proceso como control positivo, también fue identificada como tal. En la tabla 7.5 se muestra la información sobre la identificación molecular de los 26 aislados (*Metarhizium anisopliae* Cp-Oax no se incluye). En el caso del aislado identificado morfológicamente como *B. bassiana*, también se confirmó su autenticidad por la vía molecular. Tanto las secuencias de los amplicones obtenidos de cada uno de los aislados, como lo resultados de la identificación de los mismos, pueden consultarse en los anexos D y E respectivamente.

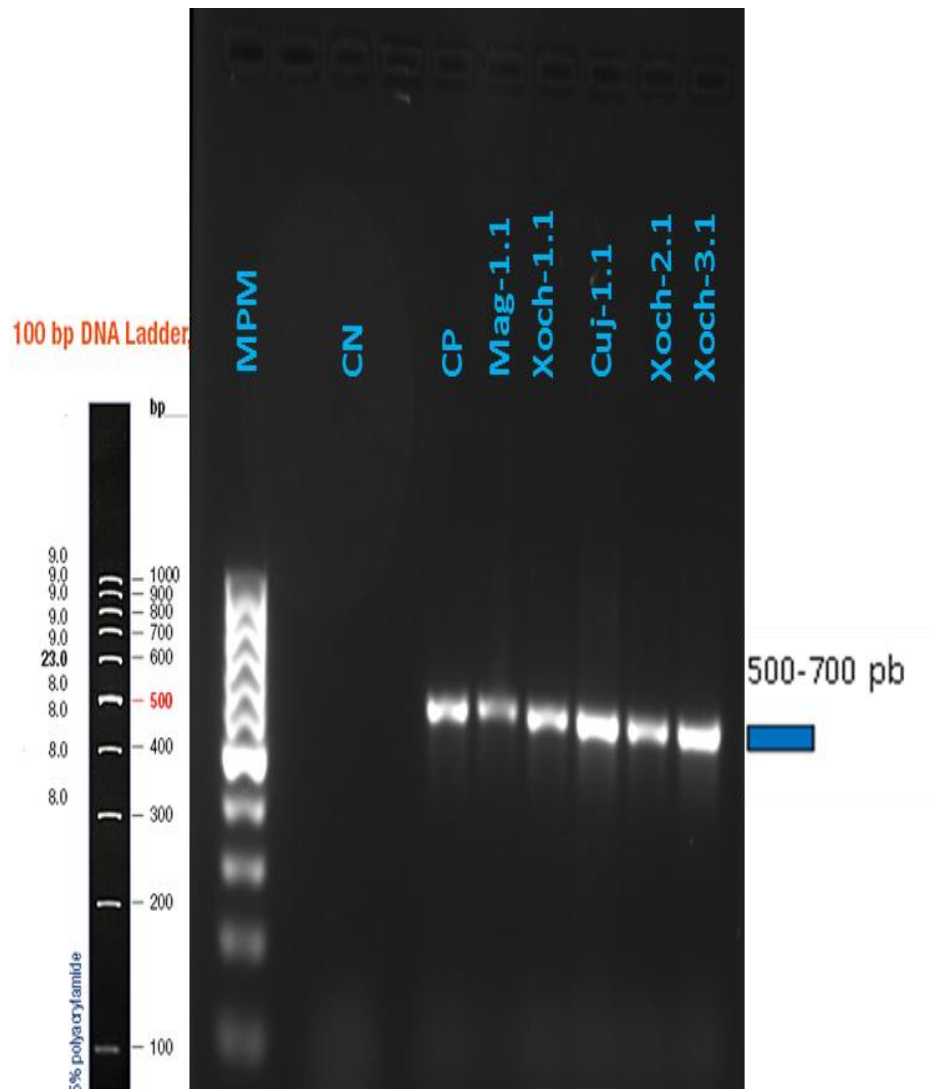


Figura 7.1. Gel de electroforesis de los productos de PCR de los aislados *Metarhizium* sp Mag-1.1, *Metarhizium* sp Xoch-1.1, *Metarhizium* sp Cuj-1.1, *Metarhizium anisopliae* Xoch-2.1 y *Metarhizium* sp Xoch-3.1. El control positivo (CP) utilizado fue *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotae* CP-Oax. El control negativo (CN) es la mezcla de la reacción de PCR sin muestra de ADN fúngico y el marcador de peso molecular (MPM), es el valor de referencia de peso molecular.

No	Localidad	Fuente	Identificación molecular	Longitud de conidio (µm)	Longitud deconidióforo (µm)	Longitud de filídes (µm)	Color de conidios	Color de micelio
1	San Lorenzo Acopilco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Cuj-1.1	6.5±0.6	8.9±3.07	10.4±3.26	Verde olivo	amarillo
2	San Lorenzo Acopilco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Cuj-2.1	6.5±0.6	7.9±3.76	9.4±2.78	Verde olivo	amarillo
3	San Lorenzo Acopilco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Cuj-3.1	6.5±0.38	8.6±2.76	11.5±3.26	Verde olivo	amarillo
4	San Lorenzo Acopilco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Cuj-4.1	6.5±0.54	8.4±3.83	10.2±2.96	Verde olivo	amarillo
5	San Lorenzo Acopilco	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Cuj-5.1	5.9±0.6	9.9±3.83	12.1±5.50	Verde olivo	amarillo
6	San Nicolás Totolapan	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp-Mag-1.1	6.3±0.43	10.4±3.51	9.6±2.49	Verde olivo	amarillo
7	San Jerónimo Miacatla	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Mia-1	6.1±0.81	12.8±0.42	9.9±3.09	Verde olivo	amarillo
8	San Jerónimo Miacatla	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Mia-2	6.43±0.41	12.2±5.29	12.4±5.08	Verde olivo	amarillo
9	San Jerónimo Miacatla	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Mia-3.1	6.2±0.52	13.3±3.88	17.3±8.24	Verde olivo	amarillo
10	San Jerónimo Miacatla	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Mia-4.1	6.1±0.42	7.3±4.30	10±3.62	Verde olivo	amarillo
11	San Juan Ixtayopan	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Tac-1.1	5.9±0.43	8.1±3.38	8.5±5.12	Verde oscuro	blanco
12	San Juan Ixtayopan	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-2.1	6.3±0.60	10.9±4.58	13.4±7.04	Verde oscuro	blanco
13	San Juan Ixtayopan	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-3.1	6.3±0.53	10.8±3.83	13.4±3.86	Verde olivo	blanco
14	San Juan Ixtayopan	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-4.1	6.6±0.56	11.2±4.57	11.5±4.88	Verde olivo	blanco
15	San Juan Ixtayopan	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Tac-5.1	6.0±0.76	12.3±5.88	8.9±3.19	Verde olivo	amarillo
16	San Juan Ixtayopan	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-6.1	6.8±0.51	11.8±3.52	12.3±4.10	Verde olivo	amarillo
17	San Juan Ixtayopan	Insecto	<i>Beauveria bassiana</i> Tac-1	2.65±0.48	7.74±0.63	6.53±0.48	Blanco	Blanco
18	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Xoch-1.1	6.6±0.32	7.7±0.3	10.4±0.51	Verde olivo	amarillo
19	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Xoch-2.1	6.4±0.19	14.4±0.21	10.2±0.29	Verde olivo	amarillo
20	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Xoch-3.1	6.0±0.12	12.8±0.14	11.9±0.61	Verde olivo	amarillo
21	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Xoch-4.1	6.2±0.15	15.0±0.16	15.9±0.89	Verde olivo	amarillo
22	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium anisopliae</i> Xoch-5.1	5.9±0.12	11.8±0.45	12.8±0.10	Verde olivo	amarillo
23	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-6.1	6.1±0.11	8.5±0.33	11.3±0.45	Verde olivo	amarillo
24	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Xoch-7.1	6.1±0.09	13.1±0.24	10.6±0.88	Verde olivo	amarillo
25	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Xoch-8.1	6.2±0.14	10.9±0.13	9.9±0.34	Verde olivo	amarillo
26	San Gregorio Atlapulco	Suelo	<i>Metarhizium</i> sp Xoch-9.1	6.4±0.2	10.7±0.19	9.6±0.7	Verde olivo	amarillo

Tabla 7.5. La identificación se realizó tanto con métodos morfológicos como de biología molecular para los 26 aislados.

7.5. Preservación de cepas

La investigación sobre microorganismos requiere conservar y almacenar el material microbiano de interés puro y debidamente identificado, para garantizar la reproducibilidad en la experimentación, por esto es necesario contar con métodos de conservación *ex situ*; (Pinzón *et al.*, 2009). Las condiciones de almacenamiento adversas reducen severamente la viabilidad conidial y virulencia de *M. anisopliae*; las mejores condiciones de almacenamiento para la retención de la viabilidad de las esporas y la virulencia es a 4°C (Yeo *et al.*, 2003).

En este trabajo se preservaron 7 cepas del género *Metarhizium*, su viabilidad después de 5 meses de almacenamiento en glicerol al 10% en criopreservación -80° C y en agua destilada estéril a 4° C se describe en la tabla 7.6.

Cepa	Viabilidad (%) en criopreservación a -80°C	Viabilidad (%) en agua estéril a 4°C
<i>Metarhizium</i> sp Cuj-3.1	30.81 ± 3.83	78.49±14.8
<i>Metarhizium</i> sp Mag-1.1	28.65 ± 4.41	84.49± 11.78
<i>Metarhizium</i> sp Mia-4.1	57.00 ± 8.01	75.50± 13.44
<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-3.1	4.00 ± 3.48	63.89± 2.46
<i>Metarhizium</i> sp Xoch-3.1	9.08 ± 0.48	58.52± 13.15
<i>Metarhizium</i> sp Xoch-4.1	35.81 ± 8.60	57.94± 26.99
<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-6.1	7.20 ± 2.45	82.58± 14.78

Tabla 7.6. Porcentaje de viabilidad de 7 aislados del género *Metarhizium* en dos métodos de conservación. La prueba se realizó transcurridos 5 meses.

Los resultados del método de criopreservación muestran que, el porcentaje de viabilidad de las 7 cepas tiene diferencias significativas a lo largo de los 5 meses. Las diferencias significativas fueron: en el primer mes con $F_{6, 14}=7.081$, $P<0.05$, siendo *Metarhizium* sp Xoch-4.1 la mejor cepa conservada; en el segundo mes con $F_{6, 14}= 85.31$, $P<0.05$, en éste periodo la mejor cepa fue *Metarhizium robertsii* Xoch-6.1; en el tercer mes con $F_{6, 14}=46.475$, $P<0.05$, en este caso *Metarhizium robertsii* Xoch-6.1 y *Metarhizium* sp Mia-4.1 fueron las mejores cepas; en el cuarto mes con $F_{6, 18}= 40.43$, $P<0.05$, nuevamente *Metarhizium robertsii* Xoch-6.1 es la mejor cepa y en el quinto mes con $F_{6, 11}= 38.79$, $P<0.05$, *Metarhizium* sp Mia-4.1 fue la mejor cepa (Figura 7.3).

A diferencia del método de criopreservación a -80° C, el tratamiento en agua estéril a 4° C presento diferencias significativas en dos meses: durante el primer mes con $F_{6, 14}=82.72$, $P<0.05$, las mejores cepas fueron: *Metarhizium* sp Cuj-3.1, *Metarhizium* sp Mag-1.1, *Metarhizium* sp Mia-4.1,

Metarhizium anisopliae Tac-3.1 y *Metarhizium* sp Xoch-4.1 y, en el cuarto mes con $F_{6, 11}=10.541$, $P<0.05$ las mejor conservadas fueron: *Metarhizium* sp Mag-1.1, *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1, *Metarhizium* sp Mia-3.1 y *Metarhizium robertsii* Xoch-6.1; en los restantes meses (número 2,3 y 5), no hubo diferencias significativas en la conservación por efecto del tratamiento en las 7 cepas (Figura 7.2).

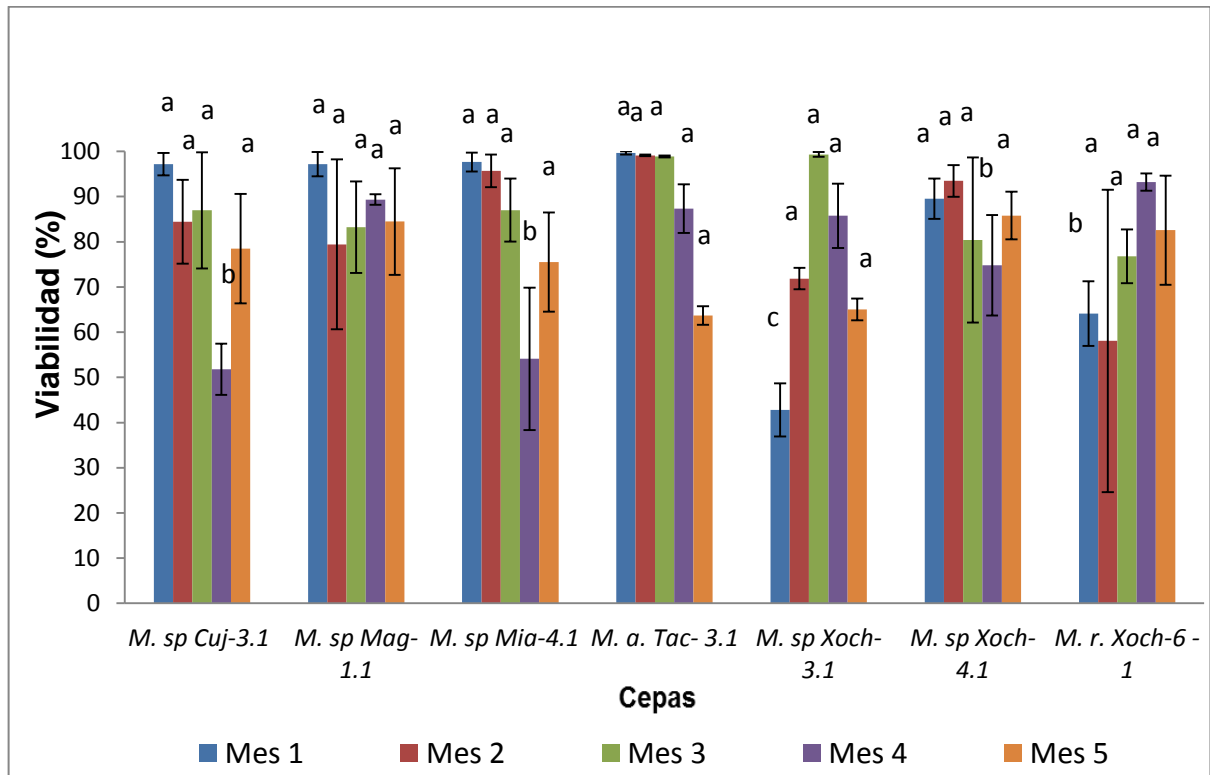


Figura 7.2. Viabilidad de 7 cepas de *Metarhizium* conservadas en agua estéril a 4° C. Se muestra la viabilidad encontrada durante los 5 meses de conservación. Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey; $P=0.05$).

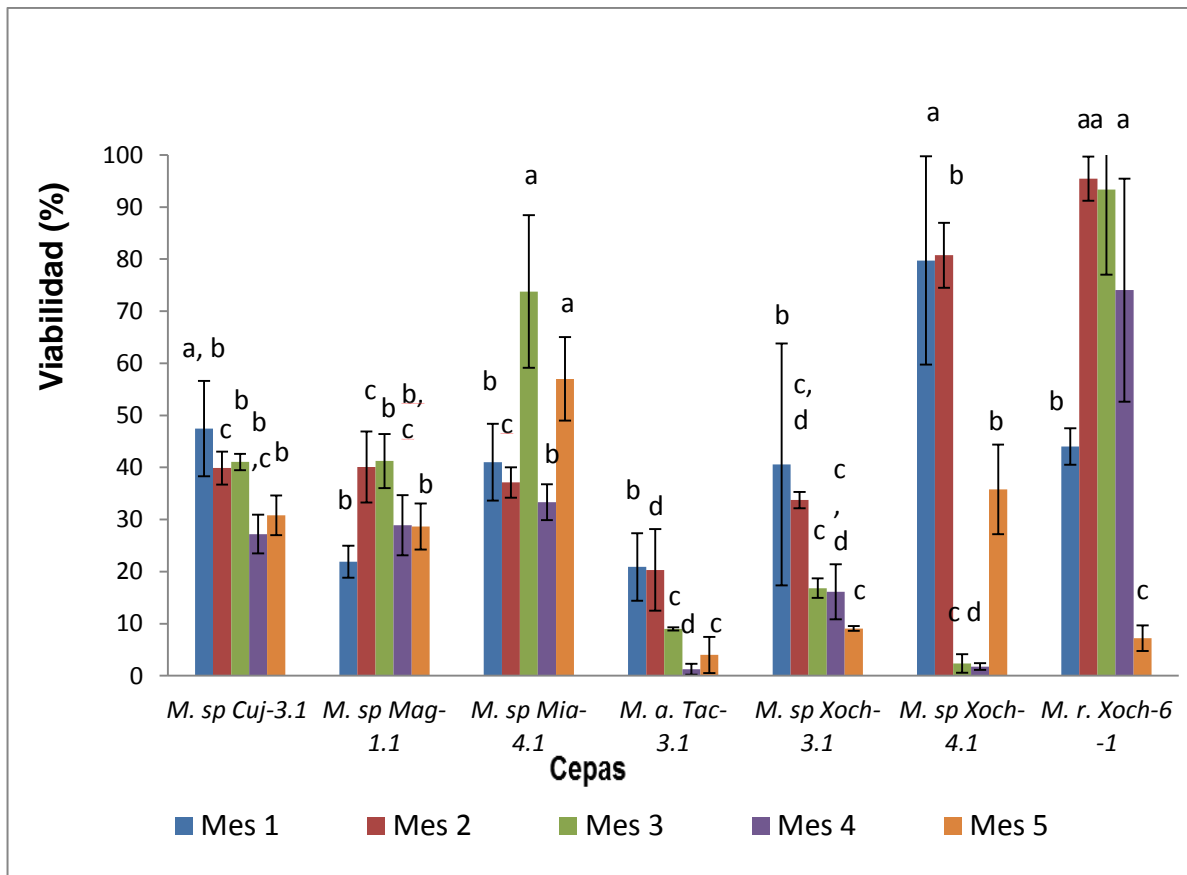


Figura 7.3. Viabilidad de 7 cepas de *Metarhizium* conservadas por el método de criopreservación (-80°C). Se muestra la viabilidad encontrada durante los 5 meses de conservación. Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey; P=0.05).

El porcentaje de conservación entre los dos tratamientos y entre cepas difiere. De esta forma, se puede observar en la tabla 7.6, en el método de agua a 4° C que *Metarhizium sp Xoch-3.1* tiene una viabilidad 58.52% y *Metarhizium sp Xoch-4.1* presenta viabilidad de 57.94; las dos cepas tienen resultados ligeramente superiores al reportado por (García-Ortiz, 2012), quien reportó 51% de viabilidad de *Metarhizium anisopliae var. lepidotae* CP-Oax preservado durante 2 meses en liofilización. Los resultados aquí reportados, tienen una gran ventaja sobre los obtenidos por García-Ortiz (2012), además de que, el porcentaje de conservación en este trabajo es a 5 meses y ligeramente mayor, el peso en la importancia de los datos, recae en que, los resultados son obtenidos con un método de conservación muy económico, comparado a la liofilización que es un método caro. Los resultados de viabilidad de: *Metarhizium anisopliae Tac-3.1* fue de 63.89%, *Metarhizium sp Cuj-3.1* fue de 78.49, *Metarhizium sp Mag-1.1* fue de 84.49%, *Metarhizium sp Mia-4.1* fue de 75.50 y *Metarhizium robertsii Xoch-6.1* fue 82.58%, también en agua estéril a 4° C, son porcentajes mucho mayores a los reportados por el autor ya mencionado. Deducciones similares se

derivan de comparar los resultados obtenidos en esta investigación con los encontrados por Ángel-Cuapio, (2011), quien conservó *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotae* CP-Oax en agua estéril por 6 meses de almacenamiento, reportando 43% de viabilidad del microorganismo.

En la presente investigación, se encontraron diferencias entre los métodos de conservación estudiados, después de 5 meses. Con el método de criopreservación a -80°C los porcentajes de viabilidad de 6 cepas fueron bajos, estando por debajo del 50% de viabilidad, excepto *Metarhizium* sp Mia-4.1 que, en el tercer y cuarto mes y, *Metarhizium* sp Xoch-4.1 durante el primer y segundo mes superaron dicho porcentaje. A pesar de que, en el último mes la viabilidad de *M. robertsii* Xoch-6.1 cayó drásticamente a $7.20\% \pm 2.45$ (Tabla 7.6), fue la cepa que mantuvo el mejor comportamiento con porcentajes superiores y ligeramente inferiores a 90% durante los 4 meses anteriores (Figura 7.2); mientras que al conservarse con agua estéril a 4°C el promedio al final del periodo fue de $82.58\% \pm 14.78$, (tabla 7.6); manteniendo durante el periodo de conservación porcentajes de viabilidad cercanos a 90%, siendo de las mejores cepas, al igual que las restantes 6 cepas, es decir, todas las cepas incrementan sus promedios de conservación a lo largo de los 5 meses de almacenamiento con respecto al método de criopreservación, mostrando algunas cepas (*Metarhizium anisopliae* Tac-3.1) porcentajes de viabilidad cercanos al 100% a lo largo del periodo de estudio (Figura 7.1). Todas las cepas mostraron porcentajes de viabilidad similares en el método de agua estéril a 4°C . Si bien, la viabilidad de *M. robertsii* Xoch-6.1 en ambos métodos es similar hasta el cuarto mes (Figuras 7.2 y 7.3), es interesante continuar su investigación, ya que, al parecer no le afectan temperaturas extremadamente bajas.

En esta investigación, el método de agua estéril a 4°C resultó ser el mejor método para la conservación de las cepas aisladas del género *Metarhizium*. López-Lastra *et al.*, (2002) encontraron que la conservación en agua estéril a 4°C es el mejor método de conservación para *Paecilomyces fumosoroseus* comparado con el método de criopreservación a -80°C .

7.6 Envío de muestras al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Las 26 cepas de HE plurispóricas y 26 monospóricas (52 cepas en total), fueron depositadas en el CNRCB para su conservación e investigación. En la UAM-I también se conservan muestras de cada HE plurispóricas y monospóricas para continuar con las investigaciones en el desarrollo de micoinsecticidas aplicables en las zonas agrícolas del DF. Como comprobante de depósito de las cepas en el CNRCB, nos fue extendido (por el CNRCB) el certificado de depósito de las cepas para su comprobación, documentos que se pueden consultar en el anexo F.

7.7. Producción de conidios.

La producción de conidios en arroz obtenida con las cepas *Metarhizium* sp. Xoch-8.1, *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1, *Metarhizium* sp Cuj-2.1, *Beauveria bassiana* Tac-1 y la cepa comercial *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 se enlista en la tabla 7.7.

Cepa	Producción (con/gssi)	
	Primer experimento	Segundo experimento
<i>Beauveria bassiana</i> Tac-1.	$6.83 \times 10^9 \pm 6.71 \times 10^8$	$2.17 \times 10^{10} \pm 2.93 \times 10^9$
<i>Metarhizium anisopliae</i> ABNMa201 ^a	-	$2.03 \times 10^9 \pm 2.88 \times 10^8$
<i>Metarhizium</i> sp. Cuj-2.1	$1.12 \times 10^9 \pm 1.76 \times 10^8$	$3.65 \times 10^8 \pm 4.33 \times 10^7$
<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-3.1	$1.58 \times 10^9 \pm 3.03 \times 10^8$	$6.51 \times 10^8 \pm 3.47 \times 10^8$
<i>Metarhizium</i> sp. Xoch-8.1	$1.52 \times 10^9 \pm 2.86 \times 10^8$	$9.92 \times 10^8 \pm 4.02 \times 10^8$

Tabla 7.7. Producción de conidios de 4 aislados y una cepa comercial de *M. anisopliae* ABNMa201. ^aNo se consideró en el primer experimento.

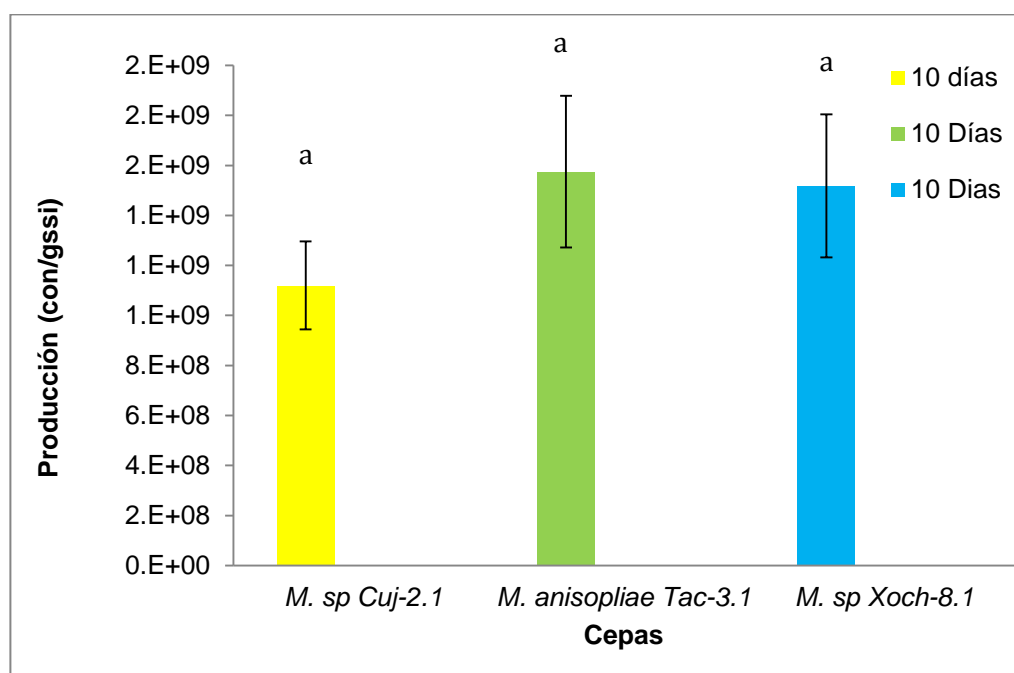


Figura 7.4. Producción de conidios de tres aislados del género *Metarhizium* (primer experimento). En ninguna de las tres cepas se encontraron diferencias estadísticas (Tukey, P= 0.05).

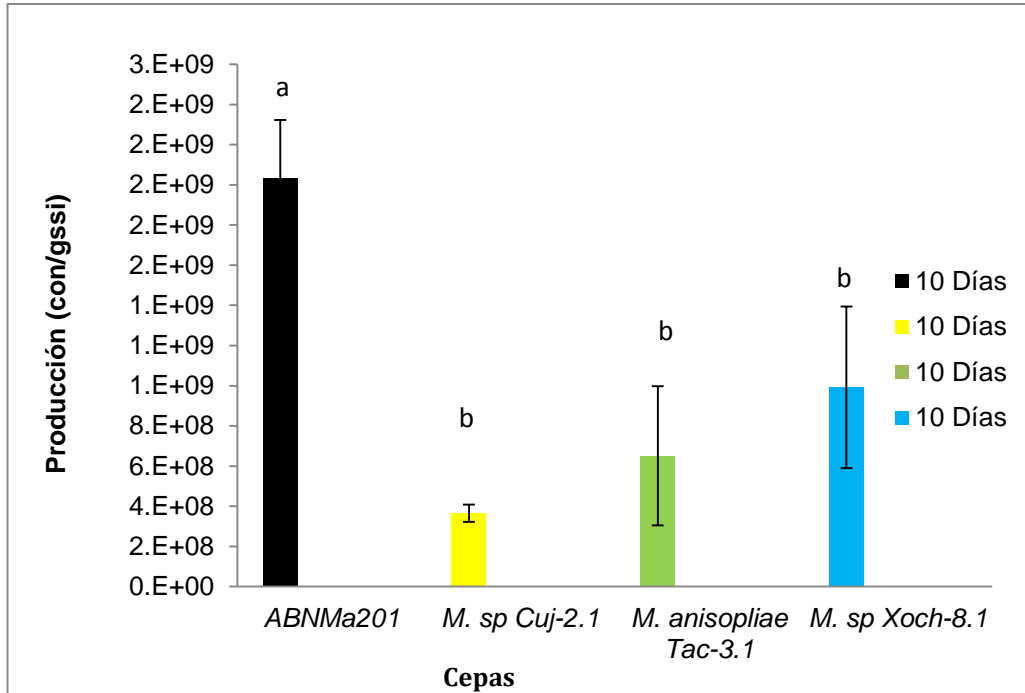


Figura 7.5. Producción de conidios de tres aislados del género *Metarhizium* y la cepa de *M. anisopliae* ABNMa201 (segundo experimento). Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey; P=0.05).

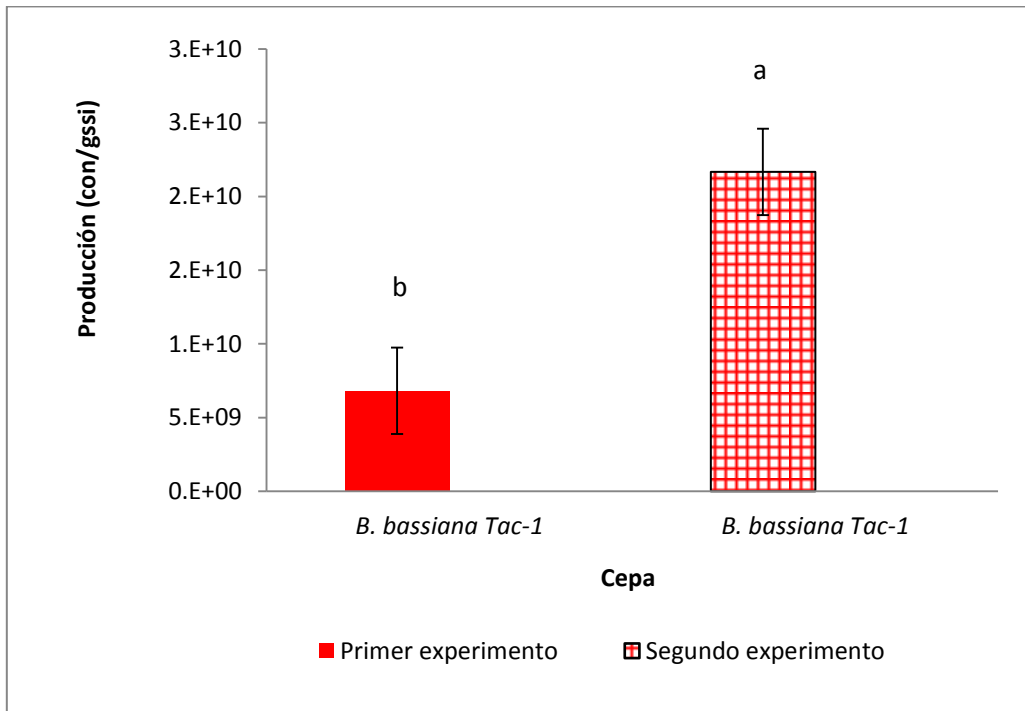


Figura 7.6. Producción de conidio a los 10 días de la cepa de *Beauveria bassiana* Tac-1. Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (t Student; P=0.05).

En la cepa *Beauveria bassiana* Tac-1, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (t Student, P= 0.05) en la producción de conidios a los 10 días (Figura 7.6). En el primer experimento la producción de *Beauveria bassiana* Tac-1 fue 6.83×10^9 con/gssi y en el segundo experimento fue de 2.17×10^{10} con/gssi (Tabla 7.7). Éstos rendimientos de conidios de *Beauveria bassiana* Tac-1 obtenidos en ambos experimentos, son mayores a los reportados por Garza-López *et al.*, (2011), quienes cultivaron conidios de una cepa de *Beauveria bassiana* en arroz y cosecharon una producción de 1.14×10^9 con/gssi. La producción del segundo experimento (2.17×10^{10} con/gssi) de *Beauveria bassiana* Tac-1, supera a la obtenida por Posada-Flórez, (2008), que cultivó esporas de otra cepa de *Beauveria bassiana* en arroz y obtuvo una producción de 1×10^{10} con/gssi. Otro autor que reporta una producción de conidios en arroz de *Beauveria bassiana* inferior a la obtenida en el segundo experimento con *Beauveria bassiana* Tac-1 es Ye *et al.*, (2006), siendo de 2.4×10^9 con/gssi. Aunque el sustrato de cultivo es el común denominador en los trabajos ya mencionados, las diferencias en la producción resaltan en favor de *Beauveria bassiana* Tac-1, aislada de la Delegación Tláhuac. Kamp y Bidoshka, (2002), mencionan que la producción de conidios es diferente entre aislados.

La producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotae* CP-Oax en arroz a los 6 días fue de 3.69×10^8 con/gssi y cuando el sustrato fue mezcla de arroz más lirio acuático (90%/10%), la producción fue de 2.7×10^8 con/gssi (Ángel-Cuapio, 2011), siendo producciones bajas comparadas con las obtenidas en el primer y segundo experimento por los aislados: *Metarhizium* sp Cuj-2.1 (1.12×10^9 con/gssi), *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 (1.58×10^9 y 6.51×10^8 con/gssi) y *Metarhizium* sp Xoch-8.1 (1.52×10^9 y 9.92×10^8 con/gssi) (Tabla 7.7). En el trabajo realizado por Freitas *et al.*, (2014), cultivaron conidios de siete aislados de *Metarhizium anisopliae* en arroz precosido durante 10 días con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, reportaron rendimientos de 1.1×10^9 , 1.37×10^9 , 1.41×10^9 , 1.56×10^9 , 1.58×10^9 , 1.75×10^9 y 1.82×10^9 con/gssi, los cuales son similares a los obtenidos en este trabajo en el (primer experimento).

Para el caso del primer experimento (con una $F_{2, 6} = 3.367$, P=0.05), no existen diferencias significativas en la producción de conidios entre las cepas *Metarhizium* sp Cuj-2.1, *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1, *Metarhizium* sp. Xoch-8.1 (Figura.4) y teniendo niveles de producción similares a la cepa comercial de *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 que, fue incluida en el segundo experimento; donde se encontraron diferencias significativas ($F_{3, 7} = 12.987$, P=0.05) en la producción en favor de la cepa comercial *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 (Figura 7.5). La diferencia podría explicarse, a que los conidios de los que se inició la producción del segundo experimento, eran conservados (en refrigeración a 4° C). La viabilidad o proporción de conidios

vivos disminuye con el tiempo, esto depende de las condiciones en las cuales son almacenados (Ángel-Cuapio, 2011). A diferencia del primer experimento, donde los conidios utilizados para la producción, provenían de constantes resiembras (aproximadamente 5), de esta forma, los conidios utilizados eran recientes, asegurando su viabilidad.

7.8. Pruebas de calidad.

7.8.1. Germinación.

De acuerdo con Lopes *et al.*, (2013) la evaluación de la germinación, es un reflejo de la calidad de los conidios de HE; y dentro de los principales factores que influyen la germinación de conidios de HE se encuentran la composición del medio, el pH, disponibilidad de agua, edad del conidio, niveles de hidratación de la célula, temperatura de incubación, humedad relativa durante la incubación, tiempo de incubación antes de evaluar la germinación, la temperatura del agua utilizada en las suspensiones y la longitud del tubo germinativo considerado en las evaluaciones. Lopes *et al.*, (2013) evaluaron la germinación de conidios de alta y baja calidad de *Metarhizium anisopliae*; incubados a 25° C por 18 h. considerando los parámetros: a) nivel de hidratación de la célula y b) temperatura del agua de la suspensión utilizada antes de evaluar la germinación. Los resultados fueron:

a) 33% y 80% de germinación para los propágulos deshidratados de lotes de baja y alta calidad respectivamente; y 63% y 95% para los propágulos hidratados.

b) la germinación promedio de conidios de baja calidad varió de 53% a 98 y la germinación de los conidios de alta calidad fue siempre $\geq 94\%$.

Cepa	Primer experimento	Segundo experimento
	(%) 15 (h)	(%) 12 (h)
<i>Metarhizium anisopliae</i> ABNMa201 ^a	-	88.85±9.36
<i>B. bassiana</i> Tac-1	96.6± 1.7	52.91±6.76
<i>Metarhizium</i> sp Cuj-2.1	87.2± 3	72.22±4.44
<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-3.1	69.1± 2.7	28.28±4.33
<i>Metarhizium</i> sp Xoch-8.1	78.7±6.83	34.77±6.98

Tabla 7.8. Porcentaje de germinación (12 y 15 h) de las cepas evaluadas y la cepa comercial ABNMa201.

^a No se incluyó en el primer experimento.

A diferencia del de Lopes *et al.*, (2013), en éste trabajo, las cepas aisladas presentan porcentajes de germinación aceptables (Tabla 7.8) a 15 horas de incubación con diferencias significativas entre los 4 aislados (Figuras 7.7 y 7.8), donde *B. bassiana* Tac-1 se presenta como la cepa que tuvo un

mayor porcentaje (96.6%) y *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 como la que tuvo menos porcentaje de germinación (69.1). Sin embargo, desde las 12 horas, ya hay diferencias significativas en la germinación, donde *B. bassiana* Tac-1 tuvo una germinación lenta, ya que, presentó 52.91% de germinación y la cepa de *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 fue la que alcanzó el porcentaje de germinación más alto (88.85) y, *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 siguió siendo la cepa con el menor porcentaje de germinación (28.28). La germinación de *Metarhizium* sp Cuj-2.1 a las 15 h fue 87.2% y a las 12 h fue 72.22%, para *Metarhizium* sp Xoch-8.1 a las 15 h fue 78.7% y a las 12 h fue 34.77; *Metarhizium* sp Cuj-2.1 siempre fue mayor a *Metarhizium* sp Xoch-8.1 y ambas siempre fueron mayores que *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 (69.1% a las 15 h y 28.28% a las 12), que se caracterizó por ser una cepa de germinación lenta (gráficos 7.7 y 7.8). Francisco *et al.*, (2006) determinaron la germinación en un lapso de 15 h a cinco cepas de *B. bassiana*, encontrando valores de germinación en un rango de 78.7 a 97.7%. Lo que demuestra que la germinación de *B. bassiana* Tac-1 es similar a los resultados encontrados en otras investigaciones; al igual que la germinación de las cepas del género *Metarhizium*.

En ambos experimentos *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 fue el aislado con menor porcentaje de germinación. En las restantes cepas del género *Metarhizium* los resultados del primer experimento no están alejados de los obtenidos por López *et al.*, (2013), en el segundo experimento sólo *Metarhizium* sp Cuj-2.1 alcanza altos porcentajes de germinación, estando abajo del preparado comercial ABNMa201 (tabla 7.8) pero hay que considerar que, él incubó las cepas durante más tiempo que en éste trabajo (tres horas más). En la investigación realizada por Freitas *et al.*, (2014), se cultivaron conidios de *Metarhizium anisopliae* en arroz durante 10 días y se determinó la germinación después de 24 horas, encontrando que el 94.84% germinó, siendo un tiempo muy grande para medir la germinación.

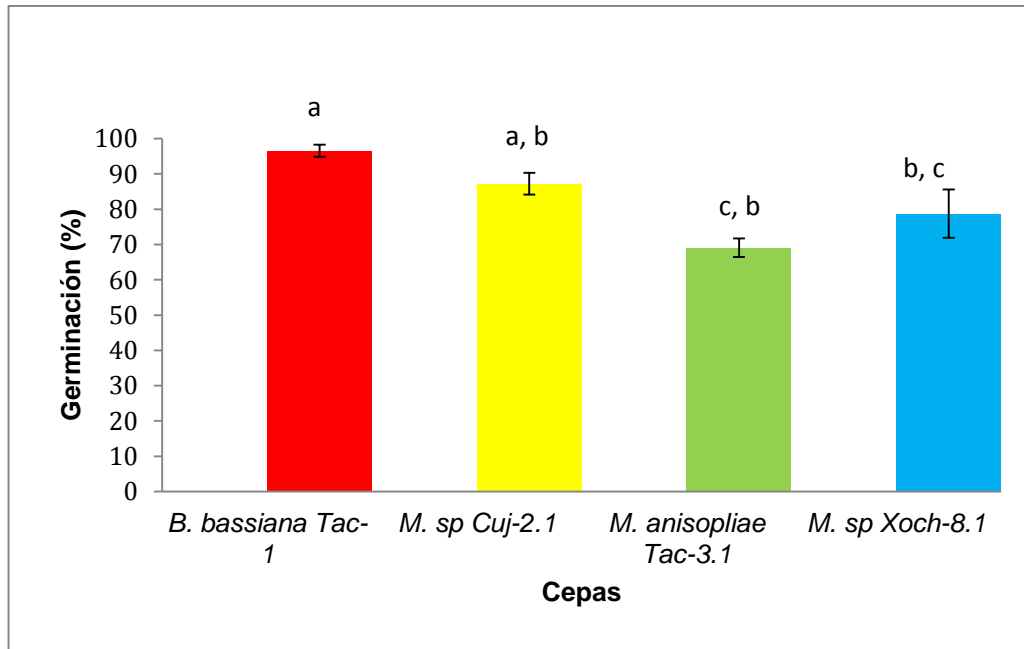


Figura 7.7. Porcentaje de germinación de las 4 cepas del primer experimento (15h). Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey; P=0.05).

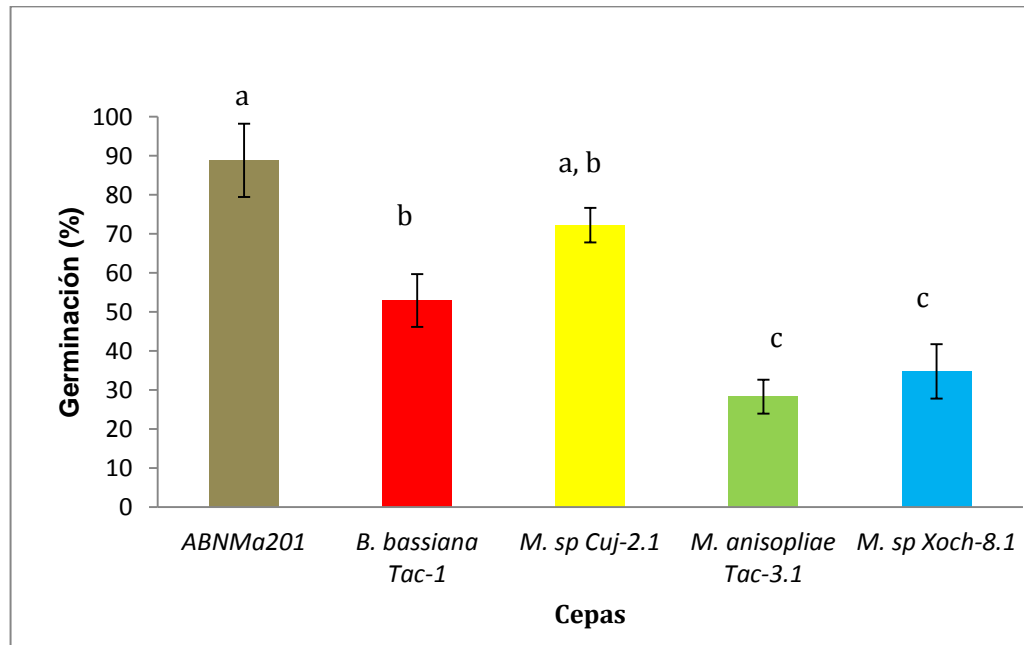


Figura 7.8. Germinación de las 4 cepas y una comercial del segundo experimento (12h). Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey; P=0.05).

7.8.2. Germinación en condiciones de hiperosmolaridad (Estrés osmótico)

Asegurar 100% de esporas viables en una aplicación es altamente deseable, con el propósito de asegurarla máxima infección. Para ser utilizados con éxito los HE como agentes de control biológico deben inducir epizootias a bajos niveles de humedad (estrés osmótico). Pero la selección en la variación del nivel de estrés ambiental en las especies de HE, puede ser un paso útil en el desarrollo de un bioplaguicida (Freitas *et al.*, 2014). Los HE necesitan la presencia de agua, en una forma disponible, para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas. La mejor forma de medir la disponibilidad de agua es mediante la actividad de agua (a_w) (Siurana *et al.*, 2003). A una actividad de agua $a_w = 0.944$ *M. anisopliae* tuvo germinación del 71.5% y 7.6% para *M. acridum*. Mientras que con un valor de $a_w = 0.973$, encontraron que la germinación fue de 77.5% en *M. anisopliae* y 18.74% para *M. acridum*, después de incubar a 25° C. por 18 h (Smith y Edgington, 2011). En lo que respecta a al presente trabajo, los resultados muestran que, con un valor de $a_w = 0.987$, *Metarhizium* sp Xoch-8.1 germinó en 87.57 y 75.80% en el primer y segundo experimento, *B. bassiana* Tac-1 germinó 77.77 y 54.58% en el primer y segundo experimento, *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 germinó 69.37 y 85.3% en el primer y segundo experimento y *Metarhizium* sp Cuj-2.1 germinó 64.50 y 95.71% en el primer y segundo experimento respectivamente; con un valor de $a_w = 0.975$, *Metarhizium* sp Xoch-8.1 tuvo germinación de 61.60 y 48.65% en el primer y segundo experimento, *B. bassiana* Tac-1 germinó 53.87 y 34.64% en el primer y segundo experimento, *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 germinó 36.90 y 55.86% en el primer y segundo experimento, y *Metarhizium* sp Cuj-2.1 germinó 62.07 y 96.59% respectivamente. En el primer ensayo, no se incluyó la cepa comercial de *Metarhizium anisopliae* ABNMa201, su germinación con valor de $a_w = 0.987$ fue 76.07% y con $a_w = 0.975$ fue de 75.10 (Tabla 7.9), es decir no se fue afectada por alta contracción de sal (0.5M de NaCl). Sin embargo, la cepa *Metarhizium* sp Cuj-2.1 se muestra como la cepa más resistente al estrés osmótico. Aunque en los resultados del segundo experimento, no se repiten los valores con respecto al primer ensayo, los promedios de los porcentajes de viabilidad muestran que, a una $a_w = 0.987$, *Metarhizium* sp Cuj-2.1 es la mejor cepa, después se ubican *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1, ABNMa201, *Metarhizium* sp Xoch-8.1 y *B. bassiana* Tac-1. De igual forma con valor de $a_w = 0.975$, *Metarhizium* sp Cuj-2.1 sigue siendo mejor que las demás cepas, quedando en segundo término la cepa comercial ABNMa201, en tercer *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1, en cuarto *Metarhizium* sp Xoch-8.1 y en último lugar *B. bassiana* Tac-1; repitiéndose en ambos experimentos tendencias (figuras 7.9 y 7.10) que, muestran a *Metarhizium* sp Cuj-2.1 como la cepa más resistente al estrés osmótico, teniendo igual porcentaje de viabilidad en ambas concentraciones de sal (0.3 y 0.5 M) en cada experimento.

Cepa	Primer experimento		Segundo experimento	
	a _w 0.987	a _w 0.975	a _w 0.987	a _w 0.975
	(0.3M)	(0.5M)	(0.3M)	(0.5M)
<i>Metarhizium anisopliae</i> ABNMa201 ^(a)	-	-	76.07 ± 7.35	75.10 ± 7.43
<i>B. bassiana</i> Tac-1	77.77 ± 2.43	53.87 ± 1.17	54.58 ± 1.07	34.64 ± 5.92
<i>Metarhizium</i> sp Cuj-2.1	64.50 ± 8.71	62.07 ± 6.54	95.71 ± 4.65	96.59 ± 5.85
<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-3.1	69.37 ± 5.64	36.90 ± 3.46	85.35 ± 6.88	55.86 ± 6.18
<i>Metarhizium</i> sp Xoch-8.1	87.57 ± 2.14	61.60 ± 6.68	75.80 ± 4.79	48.65 ± 1.93

Tabla 7.9. Porcentaje de viabilidad de los conidios de 5 cepas de hongos entomopatógenos. ^a No se incluyó en el primer experimento.

A diferencia del reportado por Smith y Edgington (2011), en donde se evaluó la viabilidad de cepas de *M. anisopliae* y con valor de a_w= 0.973 obteniendo 77.5% de germinación, en éste trabajo se encontró que *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 con a_w= 0.975, tuvo 55.86% y 36,90% en cada ensayo, éstas diferencias probablemente se deban por la mayor cantidad de sal empleadas en nuestro caso. Pero en el caso de *Metarhizium* sp Cuj-2.1 los porcentajes de viabilidad fueron 96.59% y 62.97% (primer y segundo experimento). En éste caso, el resultado de *Metarhizium* sp Cuj-2.1 es mejor que el reportado por Smith y Edgington (2011) y la diferencia podría deberse al origen de los aislados. En lo que respecta a la cepa comercial ABNMa201 (75.10% de germinación), que fue incluida en el segundo experimento, su resistencia al estrés osmótico quedó 20 puntos porcentuales por debajo de la más resistente (*Metarhizium* sp Cuj-2.1), es decir, también soporta altas concentraciones de sal

Las cepas de *M. anisopliae* y *Beauveria Bassiana* germinaron 98% con un valor de a_w= 0.99 después de 24 h de incubación (Lazzarini et al., 2006). Aunque el valor de a_w y el tiempo de germinación son mayores a los empleado en este trabajo (12 h), el resultado de *Metarhizium* sp Cuj-2.1 obtenido del segundo experimento (95.71%) es mucho mejor, porque es obtenido a una a_w más baja (a_w= 0.975) y a la mitad de tiempo de germinación y, el obtenido con *Beauveria bassiana* Tac-3.1 es muy parecido (96.6% de germinación) con respecto al primer experimento (a_w de 0.987 y 15 h de incubación).

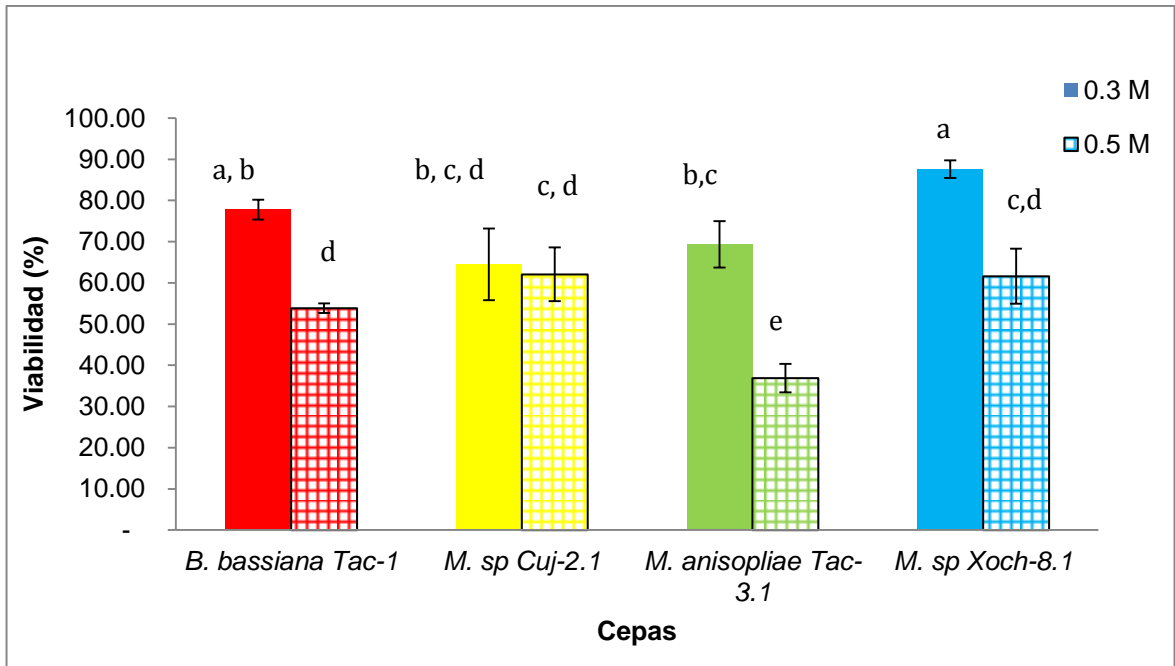


Figura 7.9. Porcentaje de viabilidad de los conidios en condiciones de estrés osmótico de las 4 cepas aisladas (primer experimento). Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey; P=0.05).

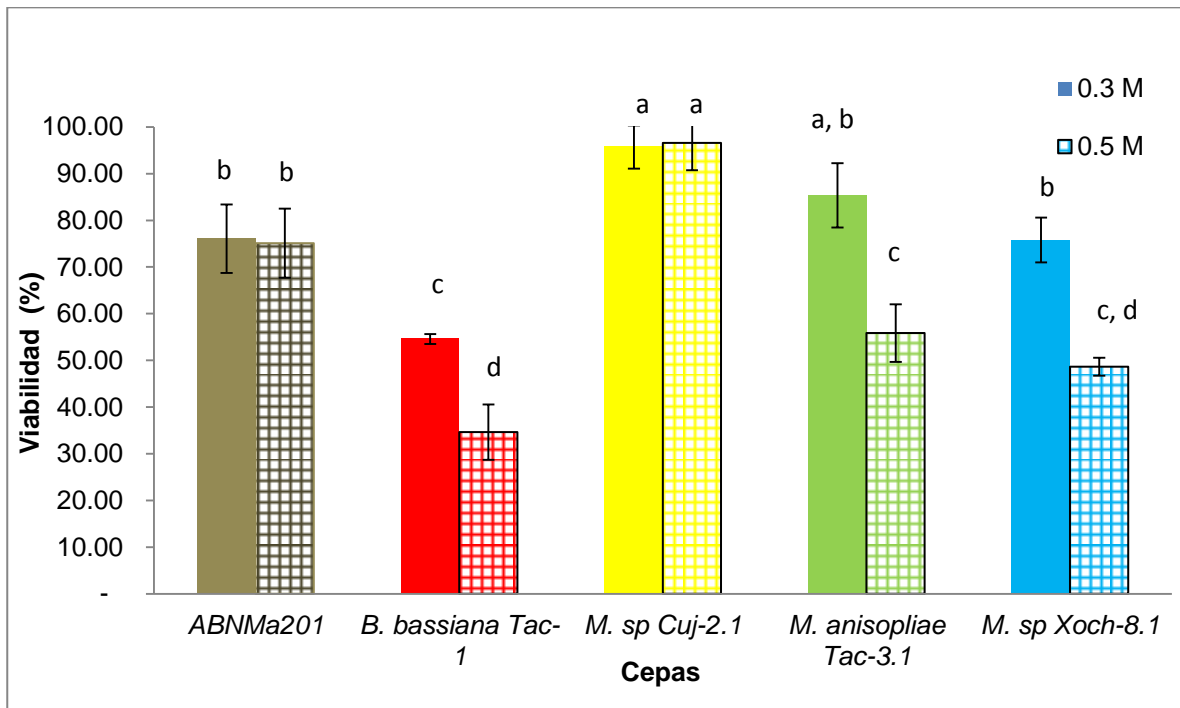


Figura 7.10. Porcentaje de viabilidad de los conidios en condiciones de estrés osmótico de las 4 cepas aisladas y la cepa comercial *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 (segundo experimento). Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey; P=0.05).

7.8.3. Termotolerancia.

En la naturaleza, la temperatura es el principal factor que influencia la actividad biológica y sobrevivencia de los conidios de los HE. Además, afecta la vida de anaquel de los biopesticidas (Magalhães y Boucias, 2004). Los conidios, ingredientes activos de los micoinsecticidas son sensibles a la temperatura y a los rayos UV (Rangel *et al.*, 2005; Ying y Feng, 2004). Así, la realización de un bioinsecticida que persista más tiempo en campo, requiere de incrementar su tolerancia a la temperatura (Hsia, 2014). La termotolerancia de conidios de los agentes de control biológico, se pueden medir mediante la exposición al estrés por calor durante un período dado de tiempo y luego examinar su viabilidad que, por lo general, está representado por la tasa de germinación (Rangel *et al.*, 2005; Ying y Feng, 2004).

Cepa	Temperatura (° C)	TS ₅₀ ^a (h)
<i>M. anisopliae</i> Tac-3.1	45	0.69 ± 0.03 (a, b)
<i>B. bassiana</i> Tac-1	45	1.07 ± 0.30 (a)
<i>Metarhizium</i> sp Xoch-8.1	45	0.58 ± 0.16 (b)
<i>Metarhizium</i> . sp Cuj-2.1	45	0.62 ± 0.13 (a, b)

^a Indica el tiempo (h) en el que 50% de los conidios son viables.

Tabla 7.10. Termotolerancia de los conidios de 4 aislados ajustados al modelo de decaimiento exponencial. Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$).

De las cepas 4 expuestas a una temperatura de 45°C, *Beauveria bassiana* Tac-3.1 fue la más termotolerante que las 3 cepas de *Metarhizium* evaluadas, ya que el valor del parámetro TS₅₀ fue de 1.07 h y siendo mayor que los obtenidos por *M. anisopliae* Tac-3.1, *Metarhizium* sp Cuj-2.1 y *Metarhizium* sp Xoch-8.1 (0.69, 0.62 y 0.58 h respectivamente) (Tabla 7.10). Los resultados son atípicos respecto de los reportados por muchos trabajos, ya que (Hsia, 2014), encontró que *M. anisopliae* fue más termotolerante en comparación con *B. bassiana* a una temperatura de 40° y 45° C durante 15 minutos de exposición. A 40° C *B. bassiana* presentó 24.3 % de viabilidad y *M. anisopliae* 56.7% y, a 45° C *M. anisopliae* registró 29.3% de viabilidad. Un resultado similar fue reportado por Horaczek y Viernstein, (2004), donde *M. anisopliae* no pierde viabilidad después de ser expuesto 15 minutos a 40 y 45° por 15 minutos. Sin embargo, cuando se expone *B. bassiana* a la misma temperatura y tiempo, sufre una reducción del 17 y el 43% en la viabilidad respectivamente. El análisis estadístico (ANOVA con $F_{3, 8} = 4.532$, $P < 0.05$) muestra la cepa *B. bassiana* Tac-1 como la más resistente al tratamiento térmico a 45° C. El resultado de *B. bassiana* Tac-1 coincide sólo con el reportado por (Ying y Feng, 2004), quien encontró la cepa de *B. bassiana* Bb2879 con valor TS₅₀ de 61-9 min a una temperatura de 48° C. Otro reporte que describe a *M. anisopliae* tolerante a altas temperaturas, es el realizado por Li y Feng, (2009), quienes expusieron 18

aislados de *M. anisopliae* a 48° C y el valor del TS₅₀ estuvieron en un rango de 14.3-150.3 min, valores que coinciden con los encontrados por en éste trabajo con los aislados del género *Metarhizium*. Se ha demostrado que, la termotolerancia característica de los conidios de los HE se relaciona con su origen geográfico (Hsia, 2014).

7.8.4. Bioensayo.

Dado que en ambos bioensayos, al menos 2 cepas, no alcanzaron el 60% de mortalidad de lavas de *Tenebrio molitor*, por lo tanto los resultados de mortalidad no pudieron ser ajustados al modelo de decaimiento exponencial propuesto por Rodríguez-Gómez *et al.*, (2008), $Y = (100 - S) e^{-k(t-t_0)} + S$. Por lo que, se decidió reportar la información del bioensayo en términos de porcentaje de mortalidad (Figuras 7.11 y 7.12). En estos términos, la cepa que presento mayor mortalidad en larvas de *Tenebrio molitor* en los dos bioensayos, fue *M. anisopliae* Tac-3.1, con 42 y 54% respectivamente. Después encontramos a *Metarhizium* sp Xoch-8.1 con 44 y 37.5% de mortalidad, enseguida el preparado comercial de *M. anisopliae* ABNMa201 de la empresa Agrobionsa cuyo porcentaje fue de 34%, *Beauveria bassiana* Tac-1 causó 32 y 26% de mortalidad y finalmente *Metarhizium* sp Cuj-2.1 tuvo 18 y 30% de larvas muertas (Tabla 7.11). En cuanto al control, no murió ninguna larva durante los ensayos.

Cepa	Primer experimento	
	Bioensayo 1 (%)	Bioensayo 2 (%)
<i>M. anisopliae</i> ABNMa201 ^a	-	34± 1.04
<i>B. bassiana</i> Tac-1	32± 1.21	26±0.75
<i>Metarhizium</i> sp Cuj-2.1	18± 0.65	30± 0.92
<i>Metarhizium anisopliae</i> Tac-3.1	42± 1.21	54 ± 1.58
<i>Metarhizium</i> sp Xoch-8.1	44± 1.07	37.5 ±1.13

Tabla 7.11. Porcentaje de muerte de larvas de *Tenebrio molitor* con 4 aislados y la cepa comercial *M. anisopliae* ABNMa201.^a No se incluyó en el primer experimento.

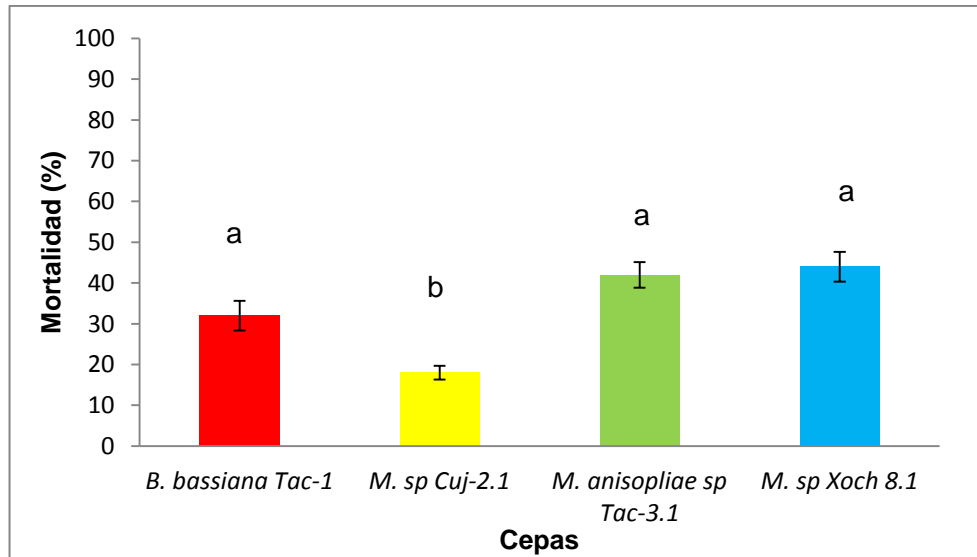


Figura 7.11. Primera prueba de infectividad de cuatro cepas de hongos entomopatógenos hacia larvas del insecto *Tenebrio molitor*. Se muestra el porcentaje de mortalidad alcanzado por cada una de las cepas después de 14 días. Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$).

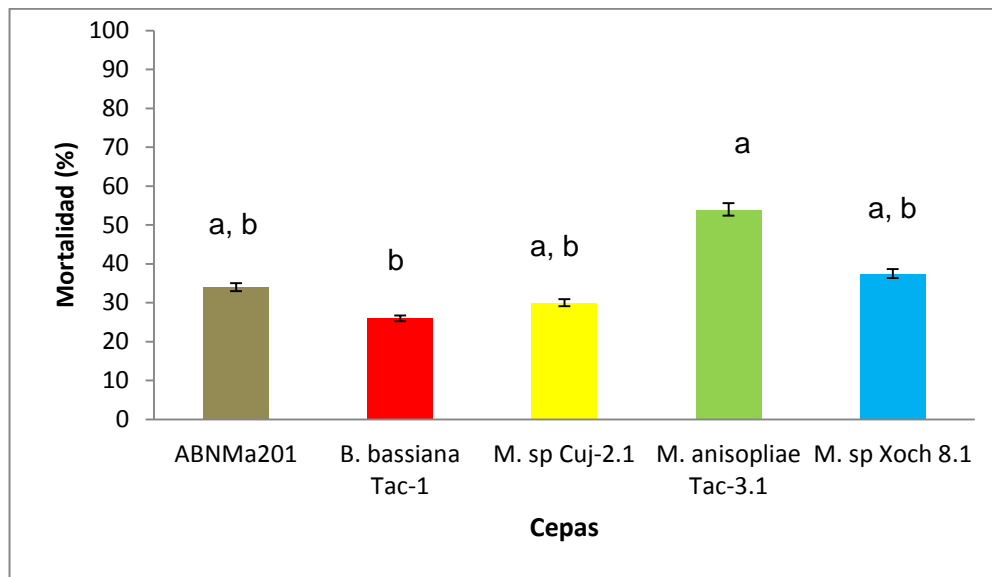


Figura 7.12. Segunda prueba de infectividad de cuatro cepas de hongos entomopatógenos y la cepa comercial *M. anisopliae* ABNMa201 hacia larvas del insecto *Tenebrio molitor*. Se muestra el porcentaje de mortalidad alcanzado por cada una de las cepas después de 14 días. Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Algunos trabajos encuentran correlación entre la germinación y la infectividad de los aislamientos, por ejemplo, en *Paecilomyces fumosoroseus* fue altamente significativa en larvas de la polilla de la

col, *Plutella xylostella* (Altre *et al.*, 1999). Al evaluar tres aislamientos contra áfidos de *Aphis fabae* Scopoli, el aislado *V. lecanii* HRI 1.72 tuvo la mayor tasa de germinación (80%), es posible que esto esté relacionado con la patogenicidad in vivo de este aislado (Yeo *et al.*, 2003). En el trabajo realizado por (Hassan *et al.*, 1989), la germinación se correlaciona con una mayor patogenicidad en mutantes de *Beauveria bassiana*. En esta investigación, no se encontró relación entre el porcentaje de germinación y la infectividad, debido a que, la cepa *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 en la prueba de germinación, presentó los porcentajes más bajos (69.9 y 28.28% respectivamente) en ambos experimentos y en la prueba de infectividad, fue la cepa que causó los mayores porcentajes (42 y 54) de muerte de larvas de *Tenebrio molitor* (Figuras 7.11 y 7.12). Sin embargo, de manera contrastante, en la investigación realizada por Montesinos-Matías *et al.*, (2011), el porcentaje de germinación de conidios de *Beauveria bassiana* esta correlacionada con parámetros de virulencia, tales como el tiempo de inicio de la muerte, el tiempo letal y máxima mortalidad en larvas de *Tenebrio molitor*.

8. Conclusiones.

- Se aislaron 26 cepas endémicas de HE silvestres de las zonas agrícolas del D.F., 25 del género *Metarhizium* y una de *Beauveria bassiana*.
- No se encontró relación entre la cantidad de materia orgánica y la clase textural del suelo con la cantidad de aislamientos de HE.
- Se encontró que el mejor método de conservación para los aislados, fue en agua destilada estéril a 4° C.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, no pudo establecerse una relación entre la germinación y la infectividad en ninguna de las cepas estudiadas.
- El aislado nativo *Metarhizium anisopliae* Tac-3.1 fue mejor que la cepa comercial de *Metarhizium anisopliae* ABNMa201 y las cepas *Metarhizium* sp Cuj-2.1 y *Metarhizium* sp Xoch-8.1 son al menos, iguales que la cepa comercial.

9. Perspectivas.

- Se sugiere determinar la infectividad de los aislados obtenidos con plagas de interés económico.
- Podrían probarse métodos que permitan mejorar la infectividad y termotolerancia de las cepas evaluadas.
- Disminuir los valores de a_w (incrementar las condiciones de hiperosmolaridad) para determinar una mayor diferencia entre las cepas evaluadas.
- Probar métodos alternativos de identificación molecular (beta tubulina, factor de elongación alpha) para ver si es posible determinar la especie de los aislados obtenidos en los que sólo se identificó el género.

10. Bibliografía.

Alatorre R, Bravo H, Leyva J, Huerta A, 2000. Manejo Integrado de Plagas. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Subsecretaría de Desarrollo Rural, Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural.

Alatorre-Rosas, R. 2007. Hongos entomopatógenos. En: Teoría y aplicación del control biológico. L. A. Arredondo-Bernal, y H. C. Rodríguez-del-Bosque. México: Sociedad Mexicana de Control Biológico. (Capítulo 9. p-140).

Alean Carreño, I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Microbióloga Agrícola y Veterinaria.

Ángel-Cuapio, R. A. 2011. Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante. México: Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Altre, J. A., Vandenberg, J. D., Cantone, F. A. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates to Diamondback Moth, *Plutella xylostella*: Correlation with Spore Size, Germination Speed, and Attachment to Cuticle. *Journal of invertebrate pathology*, 73:332-338.

Berlanga-Padilla, A. M., Hernández-Velázquez, V. M. 2002. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. a. var. acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. *Manejo Integrado de Plagas*. 63, 51-55.

Berlanga-Padilla A. 2006. Calidad de hongos entomopatógenos. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de calidad. Manzanillo Colima.

Berlanga-Padilla, A. M., M. A. Ayala-Zermeño., R. Montesinos-Matías 2015. Manual de Exploración para la Colecta de Hongos Entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, DGSV, SENASICA, SAGARPA. pp 54.

Bidochka, M.J., Kasperski, J.E., Wild, G.A.M., 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can. J. Bot.* 76, 1198–1204.

Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J., De Croos, J. A. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology*, 67:1335-1342.

Boucias D. G. Pendland J. C., 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers. 1-14

Bischoff, J. F., Rehner, S. A., Humber, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101:512-530.

Cañedo V., Alfaro A., Kroschel J. 2011. Manejo integrado de plagas de insectos en hortalizas. Principios y referencias técnicas para la Sierra Central de Perú. Centro Internacional de la Papa. 48p.

Cañedo, V., Ames, T., 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. 1-62.

Cardona, M., C. 1998. Entomología económica y manejo de plagas. Palmira: Universidad Nacional de Colombia. p.99.

Carrillo-Benítez, M. G., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Enríquez-Vara, J. N. 2013. Diversity and Genetic Population Structure of Fungal Pathogens Infecting White Grub Larvae in Agricultural Soils. *Microbial ecology*, 65: 437-449.

Castañeda, R. F. 2001. Parámetros empleados para la identificación de los hongos conidiales. Pasado y presente en la taxonomía de los Hifomicetes. *Revista de Protección Vegetal*.

Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia CENICAÑA. 2011. Utilización de hongos entomopatógenos para el control del salivazo *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). Pp. 18-21.

CORTEZ-MADRIGAL, H., 2006. Efecto de coadyuvantes en *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su virulencia hacia *Toxoptera aurantii* Boyer. Revista Mexicana de Fitopatología, v. 24, p. 59-64.

Daoust, R. A., Roberts, D. W. 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. Journal of invertebrate pathology, 41:143-150.

del Distrito Federal, G. 2007. Programa General de Desarrollo del Gobierno del Distrito Federal, 2007-2012. México, DF.

de la Federación, D. O. (2002). NOM-021-SEMARNAT-2000. Norma Oficial Mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis, 31.

de Nadal, Eulalia, Paula M. Alepuz., Francesc Posas. "Dealing with osmoses through MAP kinase activation." EMBO reports 3.8 2002:735-740.

Faria, M., Wraight, S., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control, 43: 237-256.

Francisco, E. A., Mochi, D. A., Correia, A. D. C. B., Monteiro, A. C. 2006. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. Ciência Rural, 36:1309-1312.

Freitas, A. F., Loureiro, E. D. S., Almeida, M. E. B. D., Pessoa, L. G. A. 2014. Yield of conidia and germination of different isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) grown on rice. Arquivos do Instituto Biológico, 81:75-78.

Galvão, J. A., Bettiol, W. 2014. Effects of UV-B radiation on *Lecanicillium* spp., biological control agents of the coffee leaf rust pathogen. Tropical Plant Pathology, 39:392-400.

García-Gutiérrez, C., González-Maldonado, M. B., 2010. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en Comunidades Rurales. Ra Ximhai 6:17-22.

García-Ortiz, N. 2012. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum* en atmósferas oxidantes. México: Tesis de maestría: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Garza-López, P. M., Konigsberg, M., Saucedo-Castañeda, G., Loera, O. 2011. Perfiles diferenciales de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. en respuesta al CO₂: producción de conidios y amilasas. *Agrociencia*, 45:761-770.

Ghanbary, M. A., Asgharzadeh, A., Hadizadeh, A. R., Sharif, M. M. 2009. A Quick Method for *Metarhizium anisopliae* Isolation from Cultural Soils. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 4(2).

Glare, T. R., 2004. Biotechnological potential of entomopathogenic fungi. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. Mycology Series. 21:79-90.

Gobierno del Distrito Federal. Gaceta Oficial del Distrito Federal. 2010. Programa de Agricultura Sustentable a Pequeña Escala en la Ciudad de México. Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades (SEDEREC). pp. 167-168.

Godoy, J., Valera, R., Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24 (3).

Goettel, M. S., Inglis, G. D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. *Manual of techniques in insect pathology* 5, pp 213-248.

Goettel, M., S., A. E. Hajek. 2000. Evaluation of nontarget effects of pathogens used for management of arthropods. In: Wajnber, E., Scott, J.K. and P.C. Quimby. Eds. *Evaluating Indirect Ecological Effects of Biological Control*. CAB International. Wallingford, UK. 81-97.

González-Castillo, M., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R. 2012. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Acta Química Mexicana* 4 (8).

Gutiérrez, Y. A. P., Bustamante, S. L., Buitrago, G. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11:8-18.

- Hajek, A.E., 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogen. *Adv. Microb. Ecol.* 15:193–249.
- Hassan, A. E. M., Dillon, R. J., y Charnley, A. K. 1989. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54:277-279.
- Hernández-Velázquez, V. M., Cervantes Espíndola, Z., Villalobos, F. J., García, L. L., Peña Chora, G. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*, 27:591-599.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 411-453.
- Horaczek, A., H. Viernstein, 2004. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biol. Cont.*, 31:65–71
- Hsia, I. C. C., Islam, M. T., Ibrahim, Y., How, T. Y., Omar, D., 2014. Evaluation of Conidial Viability of Entomopathogenic Fungi as Influenced by Temperature and Additive. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16:146-152.
- Humber, R. A. 2012. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)*. Chapter VI – Identification of Entomopathogenic fungi (pp. 155, 156 y 179). E.U. Kindle.
- Hussein, K. A., Abdel-Rahman, M. A., Abdel-Mallek, A. Y., El-Maraghy, S. S., Joo, J. H., 2010. Climatic factors interference with the occurrence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in cultivated soil. *African Journal of Biotechnology*, 9:7674-7682.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2007. Censo Agropecuario.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2002.

Ibrahim, L., M BUTT, T., Jenkinson, P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research, 106:705-715.

Kamp AM, Bidochka MJ. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Letters in Applied Microbiology 35:74-77.

Keller, S., Kessler, P., Schweizer, C., 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. BioControl 48:307–319.

Keller, S., Zimmerman, G., 1989. Mycopathogens of soil insects. In: Wilding, N., Collins, N. M., Hammond, P. M., Webber, J. F. Insect-Fungus Interactions. Academic Press, London, UK.

Khachatourians G., G.1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: Arora, D. K, Ajello, L and K.G. Mukerji. Eds. Handbook of Applied Mycology v. 2: Humans, animals and insects. Dakker. Nueva York, EEUU. pp 613-661.

Klingen, I., Eilenberg, J., Meadow, R. 2002. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. Agriculture, ecosystems and environment, 91:191-198.

Lacey, L. A., Brooks, W. M. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. Manual of techniques in insect pathology, 1-16.

Lacey, L., A., H. K. Kaya. 2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 911 pp.

Lazzarini, G. M. J., Rocha, L. F. N., Luz, C. 2006. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. Mycological Research, 110:485-492.

Li, J., Feng, M. G. 2009. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. Mycological research, 113:93-99.

Lopes, R. B., Martins, I., Souza, D. A., Faria, M., 2013. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Journal of invertebrate pathology*, 112:236-242

López-Lastra, C. C., Hajek A. E, Humber R. A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 80:1126-1130.

López Pérez M, Rodríguez Gómez D, Loera C. O, 2014. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid state cultura. *Crit Rev Biotechnol*. 1–8.

Magalhães, B.P. y D.G. Boucias, 2004. Effects of drying on the survival of conidiospores of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver y Milner. *J. Orthop. Res.*, 13:155–159.

Margalef, R. 1991. *Ecología*. Barcelona, España. Ediciones, Omega, S. A. Séptima reimpresión.

Meyling, N. V. 2007. *Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment laboratory manual*.

Meyling, N. V., Eilenberg, J. 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, ecosystems & environment*, 113:336-341.

Meyling, N. V., Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological control*, 43:145-155.

Meyling, N. V., Lübeck, M., Buckley, E. P., Eilenberg, J., Rehner, S. A. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology*, 18:1282-1293.

Miranda Hernández F, Saucedo Castañeda G, Alatorre-Rosas R., Loera O., 2014. Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. , *Pest Management Science*. 70:661-666.

Montesinos- Matías R. 2008. *Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de Beauveria bassiana*. México: Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Montesinos-Matías R, Viniegra-González G, Alatorre-Rosas R, Loera O. 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-Dglucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. World Journal of Microbiology and Biotechnology.

Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios no Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa-Rica) 63:95-103.

Parsa, S., Morse, S., Bonifacio, A., Chancellor, T. C., Condori, B., Crespo-Pérez, V., Dangles, O. 2014. Obstacles to integrated pest management adoption in developing countries. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111:3889-3894.

Pérez, N., Vázquez, L. L. 2004. Manejo ecológico de plagas. CEDAR: La Habana, Cuba.

Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G., Baverstock, J. 2014. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. Journal of invertebrate pathology, 119:54-61.

Pinzón Gutiérrez, Y. A., Bustamante, S. L., Buitrago, G. 2009. Evaluating methods for preserving (*Dioscorea* sp) phytopathogenic fungii. Revista Colombiana de Biotecnología, 11:8-18.

Porcayo, L., J., 2014. Producción y aplicación en campo de conidios del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. México: Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Posada-Flórez, FJ (2008). Producción de *Beauveria bassiana* esporas de hongos en el arroz para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. Diario de Insectos Ciencias, 8 (1).

Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J. A., Maranhao, E. A., Ortiz-Urquiza, A., y Santiago-Álvarez, C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. Mycological research, 111:947-966

Rangel, D. E., Braga, G. U., Anderson, A. J., Roberts, D. W. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. Journal of invertebrate pathology, 88:116-125.

Roberts, D. W., Leger, R. J. S. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. Advances in applied microbiology, 54:1-70.

Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., Pell, J. K. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annu. Rev. Entomol., 51:331-357

Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2004. Biological control of ticks. Parasitology, 129 (S1), S389-S403.

Siurana, M. P. S., Caselles, J. R., y Barceló, S. 2003. Efecto de la actividad de agua y de la temperatura sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum*. Rev Iberoam Micol, 20:154-159.

Shah, P. A., Pell, J. K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied microbiology and biotechnology, 61:413-423.

Shuyang, L., Guoxiong, P., Yuxian, X. 2012. The adenylate cyclase gene MaAC is required for virulence and multi-stress tolerance of *Metarhizium acridum*.

Smith, C., and Edgington, S. 2011. Germination at different water activities of similarly aged *Metarhizium* conidia harvested from ageing cultures. Journal of Stored Products Research, 47:157-160.

St Leger, R. J., Roberts, D. W., 1997. Engineering improved mycoinsecticides. Trends in biotechnology. 15:83-85.

Toriello, C., Montoya-Sansón, E., Zavala-Ramírez, M., Navarro-Barranco, H., Basilio Hernández, D., Hernández-Velázquez, V., Mier, T. 2008. Virulencia y termotolerancia de Cultivos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemíptera: Cercopidae). Revista Mexicana de Micología, 28:57-66.

Torres B. C. P, García A. A, Avilés R. P, Hernández L. R, Francisco J., Olgún L, 2011. Estudio entomofaunístico del cultivo de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) en Puebla, México. Ciencias Agrícolas. 2:303-470.

Travis R. G, 2004. Biotechnological Potential of Entomopathogenic Fungi. AgResearch, Lincoln, New Zealand.

Vargas Mendoza, A. Flores Hernández, A. Basaldua Suárez J. F., 2008. Dinámica poblacional de las principales plagas de nopal opuntia spp en la zona semiárida de Querétaro. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. Revista Chapingo Serie Zonas Aridas. 7:21-27

Walstad, J. D., Anderson, R. F., Stambaugh, W. J. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate pathology, 16:221-226.

Yeo, H., Pell, J. K., Alderson, P. G., Clark, S. J., Pye, B. J. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. Pest Management Science, 59:156-165

Ying, S.H. and M.G. Feng, 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. J. Appl. Microbiol., 97:323–331

Zimmermann, G. 1986. The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. J. Appl. Entomol. 102: 213-215.

Consulta

Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CVAVEG), A.C. Manual de Plagas y Enfermedades en Maíz. http://www.cesaveg.org.mx/html/folleto/folleto_11/folleto_maiz_11.pdf. 18 de marzo de 2015.

Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (SEDUVI (a)). Decreto que contiene el Programa delegacional de desarrollo urbano de la delegación Álvaro Obregón. <http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/index.php/programas-de-desarrollo/programas-delegacionales>. 18 de marzo de 2015.

Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (SEDUVI (b)). Programa Delegacional de Desarrollo Urbano de Cuajimalpa de Morelos. <http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/index.php/programas-de-desarrollo/programas-delegacionales>. 18 de marzo de 2015

Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (SEDUVI (c)). Decreto que contiene el Programa Delegacional de Desarrollo Urbano para la Delegación la Magdalena Contreras del Distrito Federal. <http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/index.php/programas-de-desarrollo/programas-delegacionales>. 18 de marzo de 2015

Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (SEDUVI (d)). Decreto que contiene el programa Delegacional de Desarrollo Urbano de la Delegación Milpa Alta. <http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/index.php/programas-de-desarrollo/programas-delegacionales>. 18 de marzo de 2015.

Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (SEDUVI (e)). Programa Delegacional de Desarrollo Urbano de Tláhuac. <http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/index.php/programas-de-desarrollo/programas-delegacionales>. 18 de marzo de 2015.

Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (SEDUVI (f)). Decreto que contiene el Programa Delegacional de Desarrollo Urbano para la Delegación Tláhuac. <http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/index.php/programas-de-desarrollo/programas-delegacionales>. 18 de marzo de 2015.

Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (SEDUVI (g)). Decreto que contiene el Programa Delegacional de Desarrollo Urbano para la Delegación del Distrito Federal en Xochimilco.

<http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/index.php/programas-de-desarrollo/programas-delegacionales>.

18 de marzo de 2015.

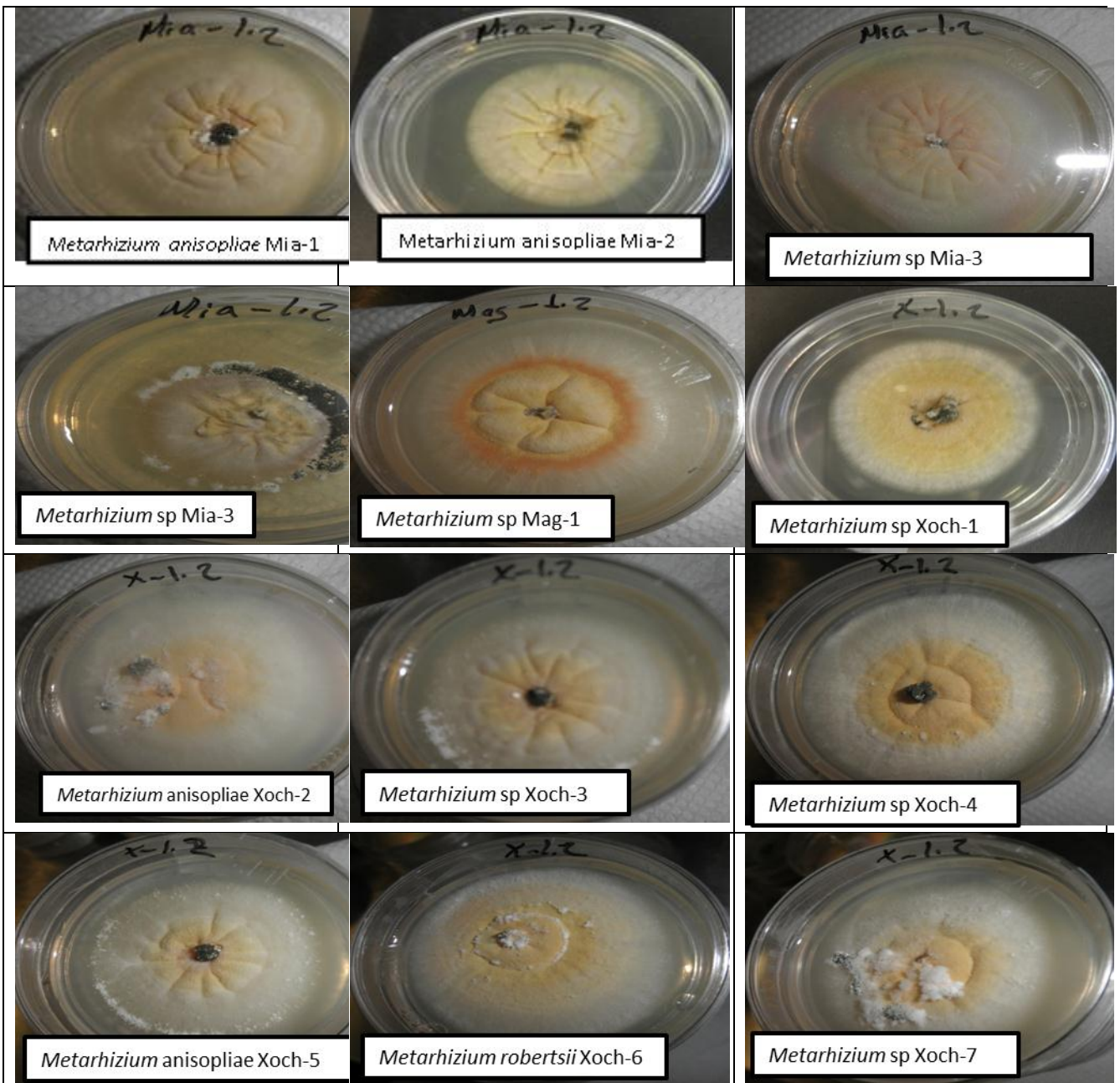
Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA (a)). Programa de Trabajo de la Campaña de Manejo Fitosanitario de maíz, a operar con Recursos del Componente Sanidad e Inocuidad del Programa de Soporte, 2009. file:///C:/Users/WIN7/Documents/Art%C3%ADculos%20para%20la%20tesis/Manejo%20Fitosanitario%20Maiz%2009_DELEGACION.pdf. 8 de marzo de 2015.

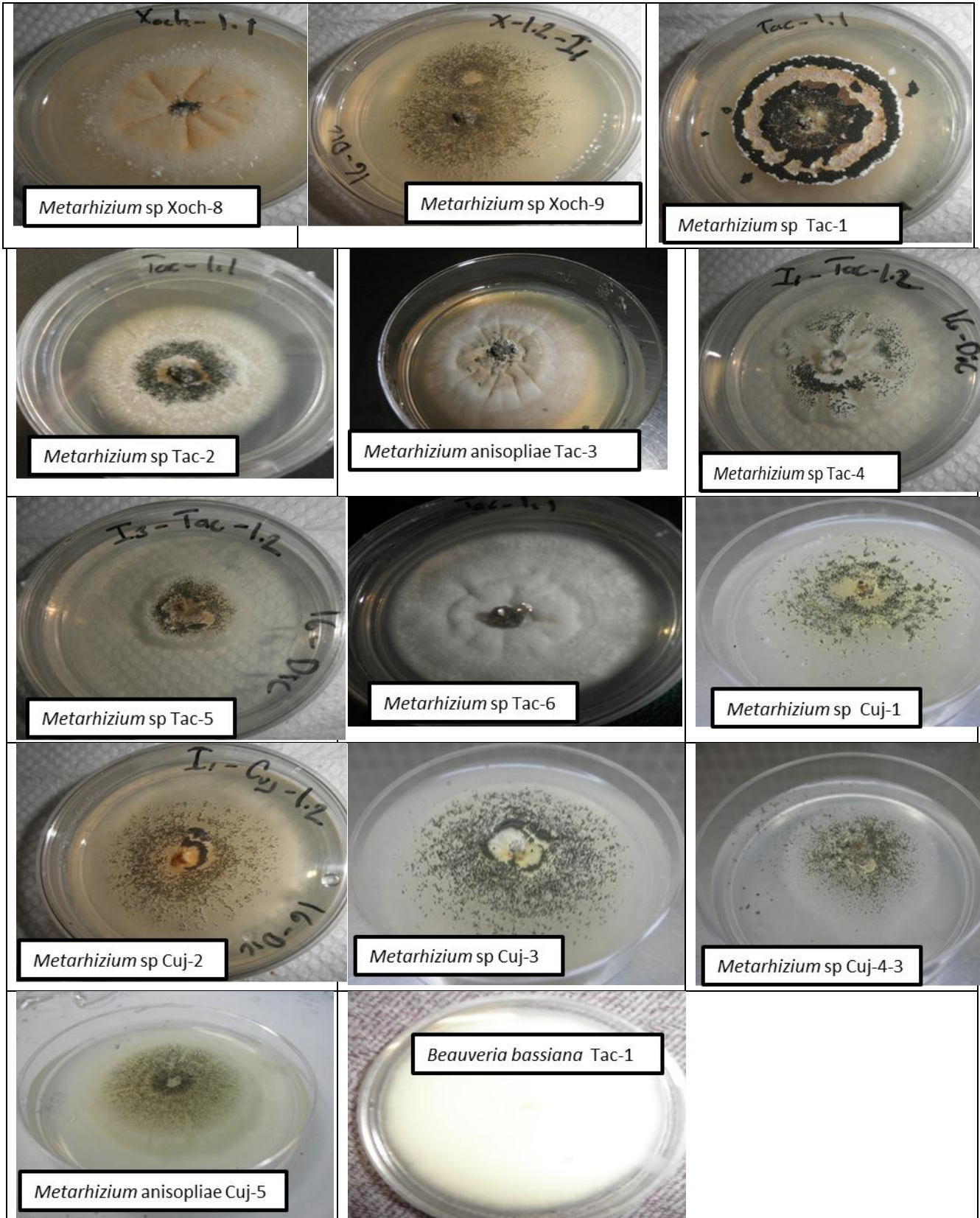
Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA (b)). Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. <http://senasica.gob.mx/?id=4157>. 18 de marzo de 2015.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SAGARPA (c)). Identificación molecular de hongos entomopatógenos e insectos entomófagos. <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=4793>. 23 de marzo 2015.

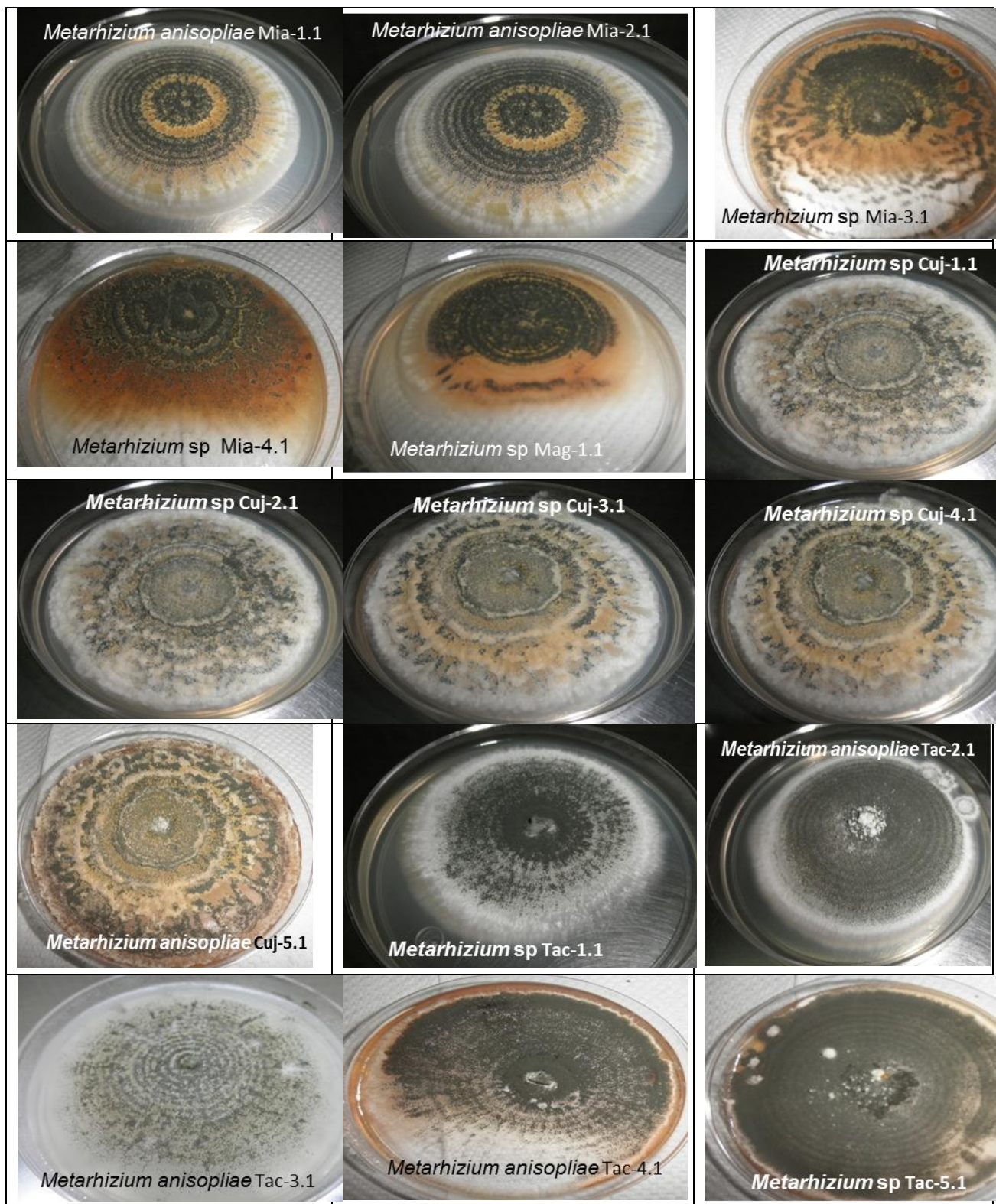
Anexos.

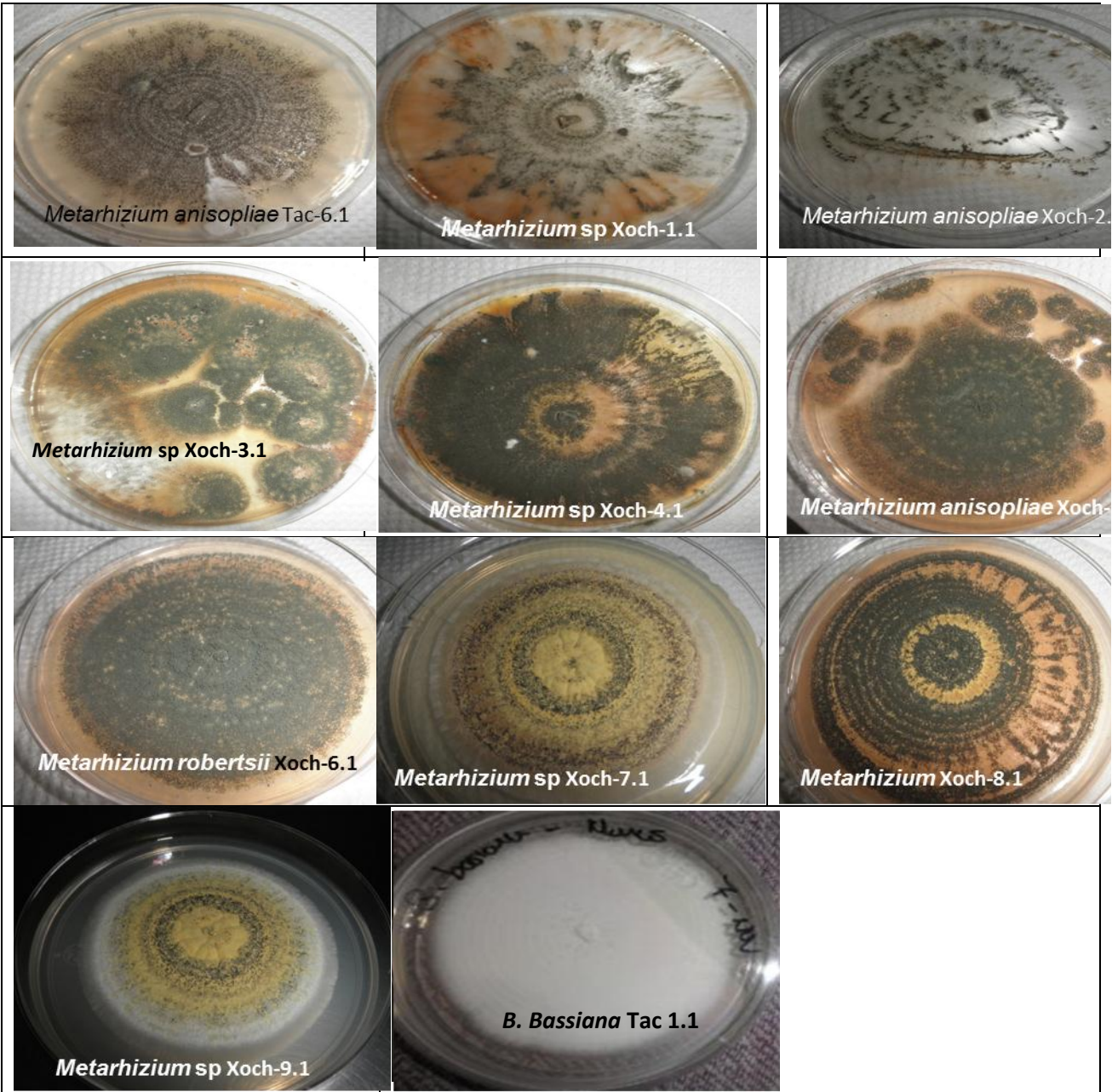
Anexo A. Aislados plurispóricos obtenidos de cinco delegaciones rurales del D.F.



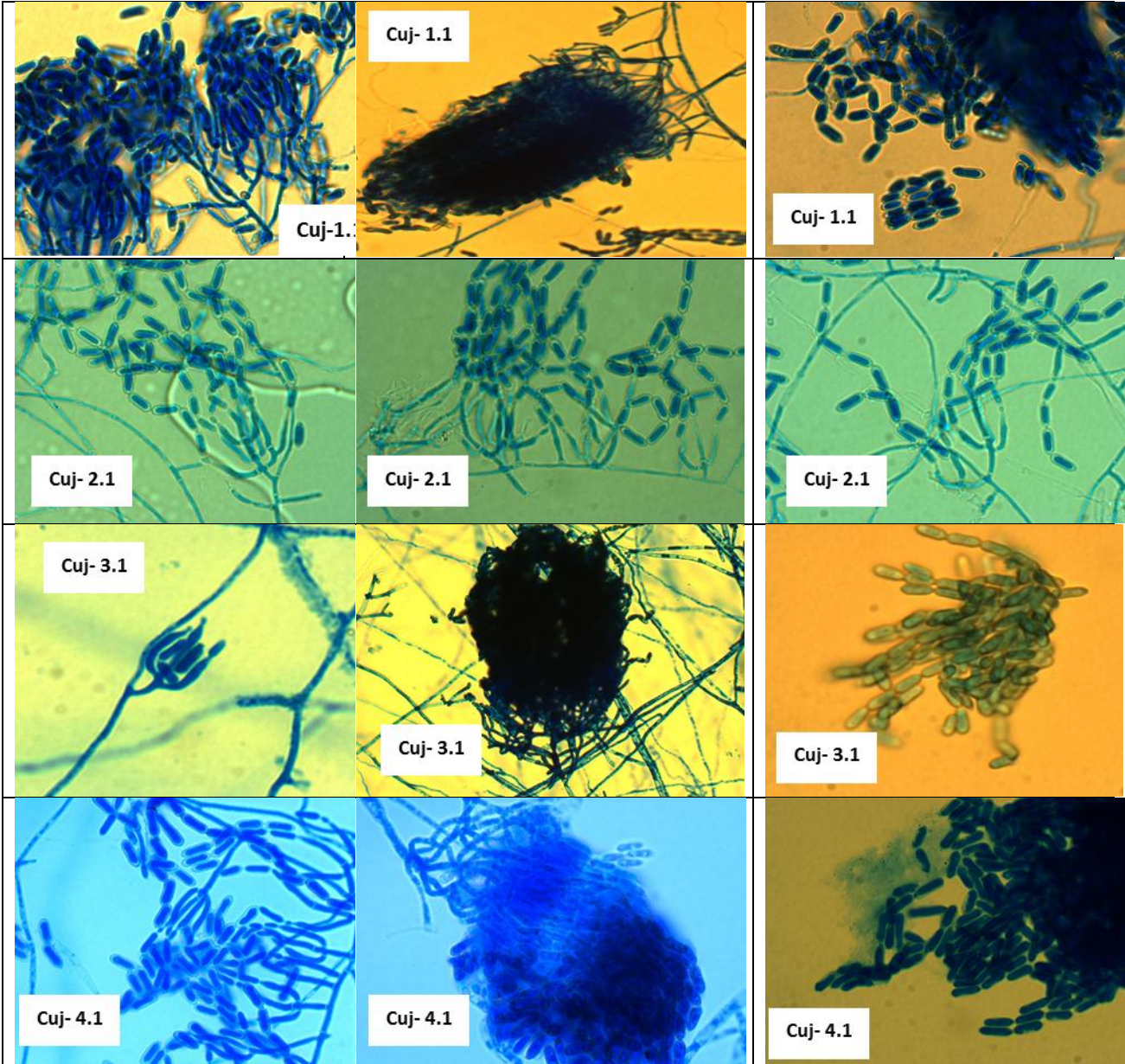


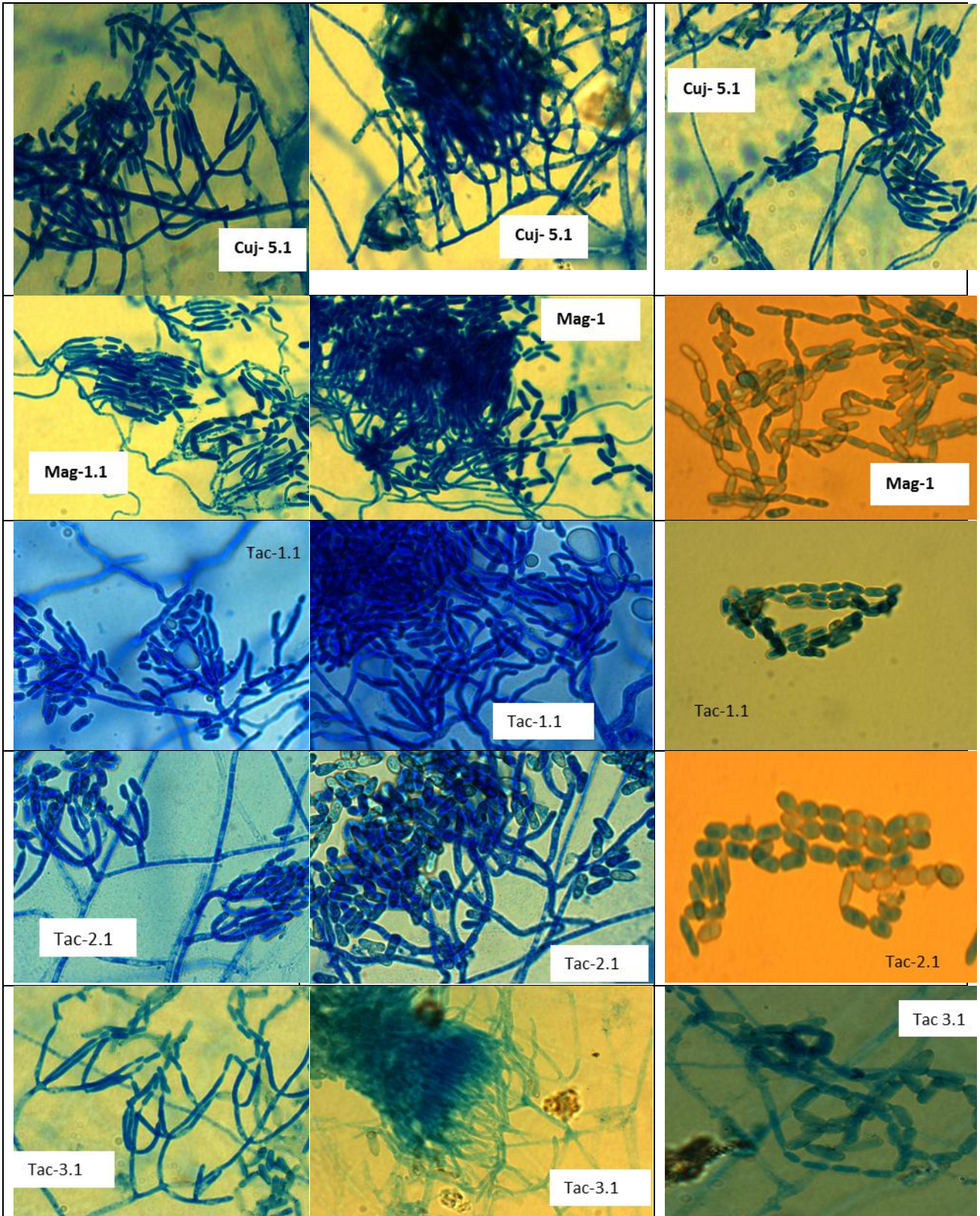
Anexo B. Aislados monospóricos obtenidos de los aislados plurispóricos (purificación).

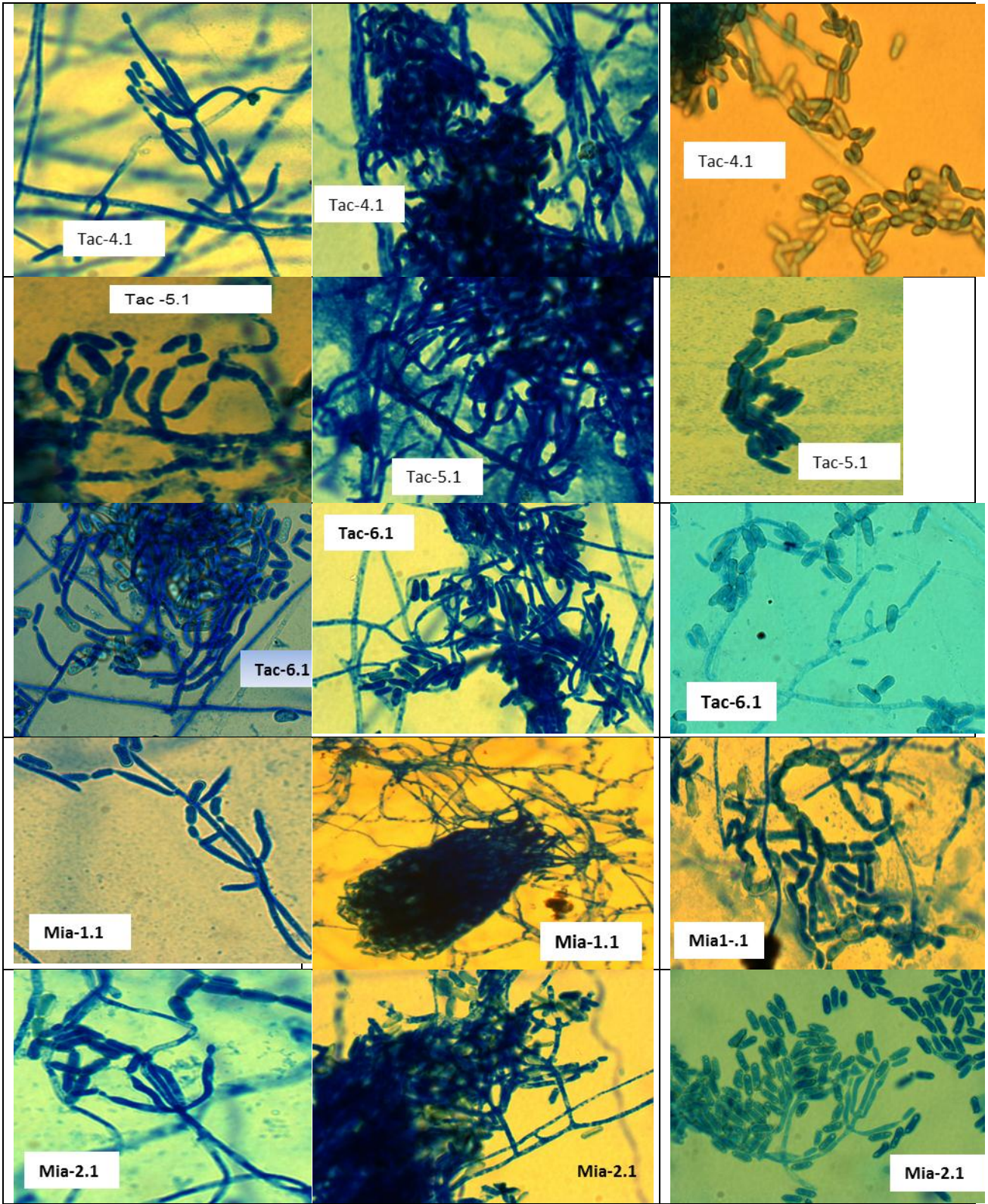


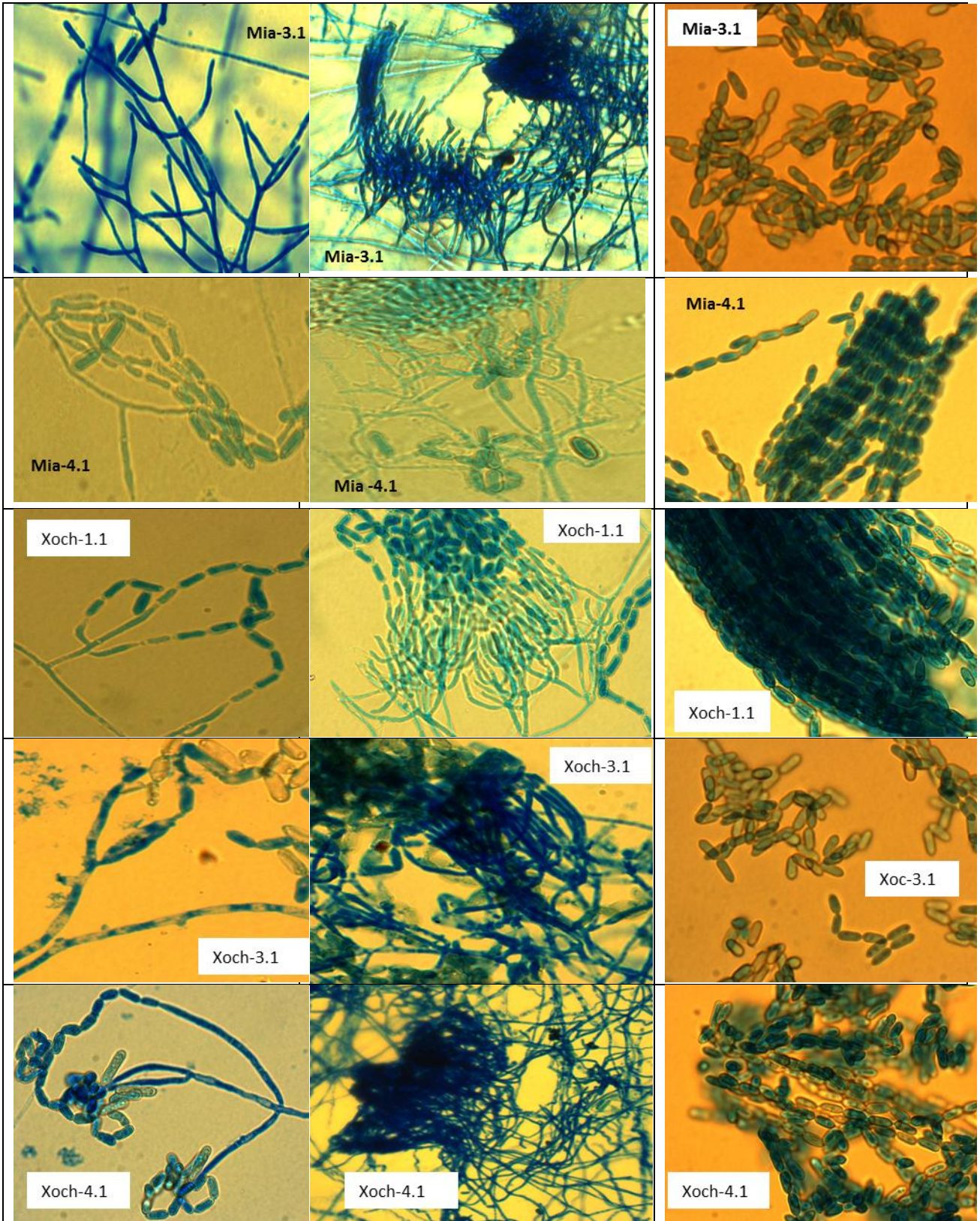


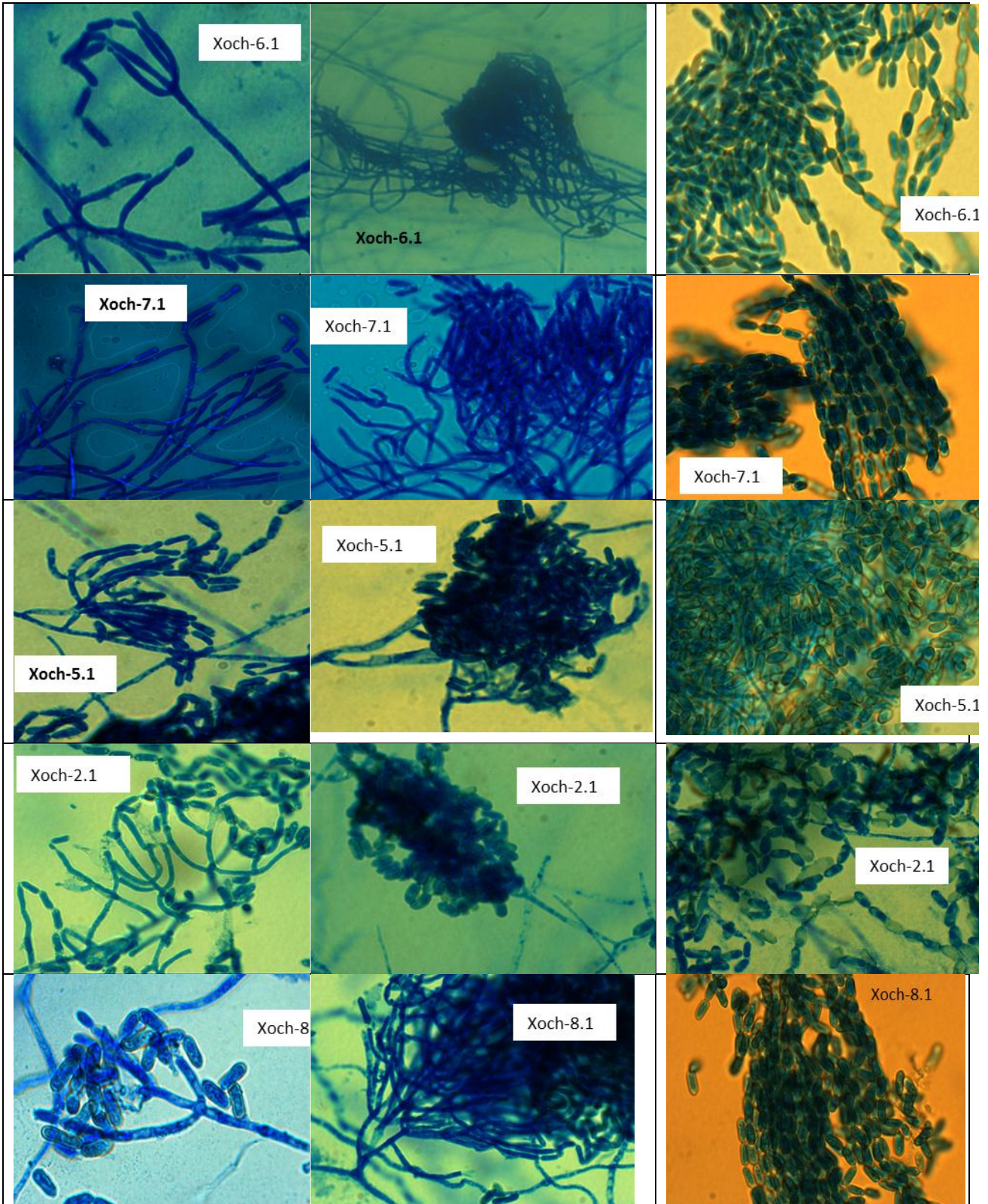
Anexo C. Estructuras reproductoras de los aislados monospóricos. (Identificación morfológica).

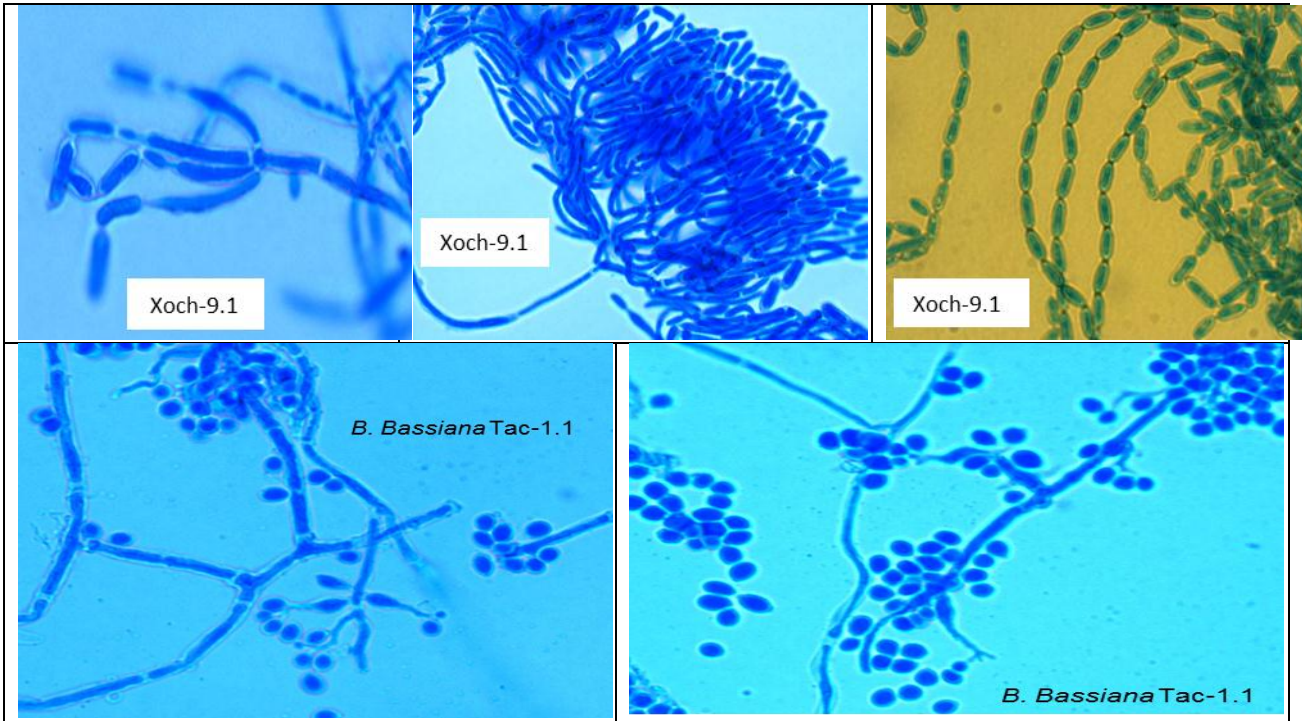












Anexo D. Secuencias amplificadas de los aislados monospóricos

***Metarhizium* sp Cuj1-1.1**

Sentido.

CGTAAATCACTCACCCCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGG
GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCG
GCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCC
TCTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAACCCCC
CAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAGAGCATATCATAAAC
CGGAGGAAACACCCTGGGGAAATAATACCTTTAATTGGTGGCTTCGGCGGGACTAGAGGCCCG
CCGGGGACCCAGACCTTCTGAACTTCTGCAGTGAGAGATCTTCCGAGTGGGTAAAGAAAAATG
AGATCAAACCTTTCCACCAACCGGGACCTCTGGGTTCTGGGCATTCTATAAAAAAAGCCAC
CTGAAATGCGTTAAGTAAGTGGCAAATAGTCAAATTCATTGAATCATCAATCTTTGGACGGCCC
AATTGTAGTCAGATCAGCATTCTAGATCGAGCATGCTAGTTCAGAGGGTCCAGCCCCCTGGTC
TACGAGACATAGTATGGGGACACGCCAGACCCTGTATCACTCAGAGCCTCCCGTACCTACTG
CGTTGCCACAGTACCTCCATAGCCG

***Metarhizium* sp Cuj-1.1**

Antisentido

TAATCGTAACTACTCATCGAGTCACTATAAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCG
GGCTCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAAT
TTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGA
CTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTG
CGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTT
CTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCA
GAAGATACTTATTAATAAATTCAGAAGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAG
CAACAATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCA
GTCACCCTACGGAAGGTATGCACTCCAACCCTGTGAATTATACTTTAATGTTGCTCGGCGGGAC
GTTTCGCGCCGCGGGACCAACCTTCTGAATTTTTATAGTATCTCTGAGTGTAAAGAATGAATCAA
ACTTTCACACGACTTGTTCTGCATCGATAGAACGCACGATGCGATAGTATGTGGATGCAATCAT
GATCAGCGACTTTGACGCAATGCGCCGTGAGTATTCTGCGCATGCTGTGCGAGCGTCATACCCC
AATACCCTTGGATGGGTTGGATGCAGCTGTTTTTCAGCACCTCCTACTTATGATTGCTGCCTCCC

TCGCATATGAACTCGCACGGACCGGCGGGTCCATGCTAAACCCAGTTTATTACCTGACGGTGA
ACCGGTAACCTAGCATTTCAGTCCGAGAGAA

Metarhizium sp Cuj-2.1

Sentido.

GCTAATCACTCCACCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGG
GACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACCTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGG
CGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCT
CTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAACCCCC
AACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTTAAGCATATCATAAAGC
GGAGGAAACAGCCCTGGGAAATTATACCTTTAATTGGTTGGTTTCGGCGGGACTTCCGCGCCCG
CCAGAAGACCCGCACCCTTCGGAATTTTTTATAAGCACCTCCGAGATGGATAAAAAAATGAA
TTCATAACTTTCAACCACGGAGCTCTCTGGGGTTGCTGCCTCCGTAGAAAACTGTAATAATT
GCCATTAAGTGATGTGCAATATGCAAGAGATTCAATGGATTCTTTCACACTTTGACGCCGCTTTG
TTCTCGGCCGCATTTCTAAGTCGGCATGCCTTGTTTCAGAGAT

Metarhizium sp Cuj-2.1

Antisentido

CCATACTACTCATCGAGTCACTATAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTC
CTGTTGCGAGTGTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAAG
GGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTGA
GGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCAGAAGAT
ACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAACAA
TTAAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCAAC
CTACGGAAAAGTTTGCCACTCCAACCCTGTGAATTATACTGTAAGTGGTGGCTCTGCGGGACTTC
GCGCCGCGGGACCAAGCTTCTGAATTTTTAATAGTATCTCTGGAGTGGTTAAAGAATGATCA
AACTTTCAACACGGACTGTGGTTCTGCATCGATAAAACGCACGATGCGATAGTATGGTGGATTG
CAGATCAGTGATCACGACTTTGACGCACATGCGCCGTCAGTATTCTGCGCATGCTGTGCGAGCG
TCATACCCCCATAAGTCCCTGAGCACAGTTGTGCGGAGAGCCGACATGTTTTCTCTCAAACACAT
CCTTAACCTAATTGGCGGTTTCGCTGACCTCTCCCTCGCAGTATGAAGACGTGACTGGACGA

CGTCCATTGCCGTAAACCCACGTTTATTACTCGACGGTGGATACCTGACTTAAAGCATCTATAC
GCGAGGAA.

Metarhizium sp Cuj-3.1

Sentido

CGGGCGGGTTTACTGATCGCGGTCAGTATCATTAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGTGCGCG
TCAGGCTCCTGTTGCGAGTGTTTACTACTGCGCAGGCCGGGCCACGGCCAGACCGTCTATTA
TTTTAAGGGACGGCTGTGCTGGTGAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACTCCAAGTCCACAGGGG
AGTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGATTGGCGCAATGTG
GGGAATGGAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCCCTTCAGATTACTTATCGCATTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCCGAACCCAGACATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAATCATTTTTTTAAACCCCT
CCAAACATACTTATTAATAAATTTCAGAGGGTTTGGGTCCCCGGCCGGCGTCAACTCACGACGAA
GAAACTATTAAGGGTATGATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCCGTAATGATGCCTCCGC
TGGTGACATCAACTGAGACCTTGCTACGAACATTTACTTCTCTAAATGACCAAGAA

Metarhizium sp Cuj-3.1

Antisentido

CCACTAGTCCGCTTATGACAGCGGAGGACATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAAT
TATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
TTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACCTTCCACAACGGATCTCTTGGTT
CTGGCATCCATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCCGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC
ATTACGCCCTCAAGTCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCTAGGCTGGTTTTCCAACA
AAGCCTTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAACACT
CGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGACTTAAACCCCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCG
AATCAAGTAGGACTACCGCGATGAACTTAAGCATATCATAAGGCCAGGAA

Metarhizium sp Cuj-4.1

Sentido.

TCTATAATCACTCACTCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCG
GGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACCT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATC
GGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTC

CTCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCC
CCAACTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACATTAAGCATATCATAAA
GCCGGAGGAAAGCCTGGTAAATATATCCGTTTAATTGTTGCTTCCGGCGGGACTATCACGCC
GCCGGGGGACCAAACCTTCTGGACTTTTTTAATAACTATCCTCTGAGTGGGTAGAAAAATGAAT
TAAAACTTTTCCACCAACGGAACCTTGGGTTCTTGCATCCAATAAAACAACGCCGCCGTAGTGC
GATTAGTTGATGTGATATTGCAGAGATTCAGCGATTCTTCGATTCTTTGGAGCGCGACTTATGA
GTTCCCGCCGATATTCCTTGTCCAGGCATTGCTAGTTTCCGAGAGGTTCTTTTGCGCCCCATCG
ACGCCCTCTGTCAGCACAGAATGTATG

Metarhizium sp Cuj-4.1

Antisentido

GGGGGTCCAAATATCAGTCCATAAAGTGGCGGTTTACGCAGTGACGCGCAGCTCTGTGCGAGT
GTTTTACTACTGCGCAGAGGTATGCACGCGAGACGCATATCAGACGCTGTGCTGAACAGCTCG
CGATCCCAACAACCAAGTCCACACAGGGGACTTGGAGGGGGCGGTTAATGGACCGCTCTCGA
ACAGGGCATGTGCCCGCCCAAGAAATACCTGAGACGGGGCGCCAATGTGTGCGGTTTTCAA
GAGTTCCGAGTAATTTCACTGTGATTTCTGCCATTTACATTTACTTTATCGCATTTCCCCGTCG
GTTTCTTCTACCGGAGGCCAGACACAAAAAATCCCGTGTTTAGAAATTTTTGATATCTTTTTTTTA
CCCCTCCAAAAATCTTTATTAATAAATATTAAGAGTGTGGGGTCCCGGGGGGGGCAAATCCCCC
AACCCCTTTTTGGGGTTTTTCCGGGGTGGGAGGGGAAAAATCGAATGTCCCCCGAGAGAATC
TCCCGAGAGAAAGGCGGTTCCCCCCCCCGGAATTTTTTTTTGGGGGGGGGTGGGGGGGCGG
GACCTTTTTTTAATTCGGGGGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGGGGGGAAAAAGGGGGGGGG
GGGGGGGAAAAAGGGGGGCGGGGGGGGGCCCCCCCCCGGGGGGGGGGGGGGTGCTCCAA
AGTGTGTCCCAAAAGCCCCCCCCCTCTTTTTATAGAAAAAAAAAAAA

Metarhizium anisopliae Cuj-5.1

Sentido.

GTTAATCACTCACTCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGG
GACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACCTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGG
CGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCT
CTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC
AACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACATTGAAACATATCATAAGC
GGAGGAAAACCTGGGAATATATACCTTTAATTGGTTGCTTCCGCGGGACTTCGCGCCCGTCG

GGGGGGCCCAAGCCTTCTGAACTTCTGAATAAGTAATCCTCCCGAAGTGGGTGAGAAAAAATG
AAATCAAACCTTTTTAACAAACAGGGACTCTCTTTGGTTCTGGCATTTCGTTGAAAAACCGCTGCAG
AGATGTGATAAGTGAAGTTGCCATATTGCGAGTATCAGCGAATCTTTGCAGCCTTTTGACGCCC
GTTTGTGTTTCTTGTGTCAGTATGTCTTGTTCGGCATTACTTTGTCTCAAAGGTCCTGTAAGCCTATT
AGTCGCGGATGGACGAGGAAGTGTGTTACACACACTCTTTATATTATGCAAGGTCTCTCTTGAC
CTTACTTTATTGACGGTATGCAACATCGTCTCATTGTGCTGATGAAACCTGCCAAACACCCGAG
TTTGCATAGCTTGATCGCGAAATCGTTATATGAAGCTATC

***Metarhizium anisopliae* Cuj-5.1**

Antisentido.

GTTAATCACTCACTCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGG
GACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACCTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTTGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGG
CGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCT
CTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAACCCCC
AACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACATTGAAACATATCATAAGC
GGAGGAAAACCTGGGAATATATACCTTTAATTGGTTGCTTCCGCGGGACTTCGCGCCCGTCG
GGGGGGCCCAAGCCTTCTGAACTTCTGAATAAGTAATCCTCCCGAAGTGGGTGAGAAAAAATG
AAATCAAACCTTTTTAACAAACAGGGACTCTCTTTGGTTCTGGCATTTCGTTGAAAAACCGCTGCAG
AGATGTGATAAGTGAAGTTGCCATATTGCGAGTATCAGCGAATCTTTGCAGCCTTTTGACGCCC
GTTTGTGTTTCTTGTGTCAGTATGTCTTGTTCGGCATTACTTTGTCTCAAAGGTCCTGTAAGCCTATT
AGTCGCGGATGGACGAGGAAGTGTGTTACACACACTCTTTATATTATGCAAGGTCTCTCTTGAC
CTTACTTTATTGACGGTATGCAACATCGTCTCATTGTGCTGATGAAACCTGCCAAACACCCGAG
TTTGCATAGCTTGATCGCGAAATCGTTATATGAAGCTATC

***Metarhizium* sp Mag-1.1**

Sentido

GAGGTGATCTACTGATCGCGGTCACTATCATTAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGAGCGCGC
CGGGCTCCTGTTGCGAGTGTTTTAGTACTGCGCAGAGCCGGGCCACGGCCAGACCGTCTATTA
ATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGTGAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACTCCAAGTCCACAGGGG
AGTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGT
GCGTTCCAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCCCTTCAGATTACTTATCGCATTTCGCTGCGT
TCTTCATCGATGCCCCAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCACTC

AAAAGATACTTATTAATAAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGACGAA
GCAACACTTAACGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATACCTCCGC
TGGTTCACCAACTGAGACCTTGAGAACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCAGGA

Metarhizium sp Mag-1.1

Antisentido

CGACTAGTTCGCTTGCTGACAGCGGTAGGACATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGA
ATTATACCTTTGATTGTTGCTTCGGCGGGAGTTCGCGCCCGCCGGGGACCCAGACCTTCTGAA
TTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTAAAAAATGAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCCATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCCGAATTCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGC
GTCATTACCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGTGAGGCTGGCTTTCCA
GCAAAGCCTACCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCACAGTAATAAAC
ACTCGCAACAGGAGACCGGCGCGGTCCACTGACTTACAACCCCTACTTTTTATAGTTGACCT
CGAATCACGTAGGACTACGCAATGAACTTAAG

Metarhizium anisopliae Mia-1.1

Sentido.

TTTAATTCACCTCCACCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGG
GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTAAAAAATGAATCAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCG
GCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCC
TCTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAACCCCTC
CAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAACC
GGAGGAAACCCCTGGGGAAATTTACCTTTAATTGTGGTTCGAAGAGAGAATTCGCGCCCGG
CGGGGACCCACACCCTCCTGAATTTATAAATAATTATATTTCTGGAGTGGGTGAAAAAATGAA
TCCAGAACTGTGCAACAACGAGATCTTTTGTTCGGCATCGATTGAAAAACGGCGGGCGGAAT
GCGAGTAAGTAAGTGCATTGCCCGAGTTCCTCTAATTCTTCTGCAAGTCTCTTTGAAGCCCAAC
ATAGCAGTCCGGTCGCATTTCTTGTCGGGCAGTGTACTGAGTCGAGG

***Metarhizium anisopliae* Mia-1.1**

Antisentido

CGTAACTTACTCATCGAGTCACTATAAGTTGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCT
CCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAA
GGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTG
AGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTT
CAAAGATTCGATGATTCCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCCTCAGAAG
ATACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCAAGTCCCGCCGAAGCAAC
AATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCC
CCCTACGGAAAGTTGCCACTCCAACCCTGTGAATTATACTTTATGTTGCTCGGCGGGACTTCGC
GCCGCCGGGACCAAGCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTCTGAGTGGTTAAGAATGATCAAAC
TTCACAACGGACTGTGTCTGCATCGATAAACGCACGATGGCGATAGTATGTGATGCAAATCAT
GATCACGACTTTGACGCACATGCGCCGTCAGTATCTGCGCATGCTGTGCGAGCGTCATACCCCC
ATCAGCTCCCTGAGACGATGTGTTGGGAAGAGCAGAACTTGTTTTTCTGCCAACCATCCTTAC
TATTGGCGGTTTTGCCTGGCCTCCCTGCGATATGAACATTCGAACAGACGACGGTCATGCCTA
AACCCACTTTAGTACCGACCGTAGATCCGTACTAAGCTCATGACGGAGAA

***Metarhizium anisopliae* Mia-2.1**

Sentido.

TCTAATCACTCACCCCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGG
GACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGATCAAACTTTC
AACACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGG
CATGCCTGTTGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGC
GAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC
TGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAACCCCCCA
ACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAGATTTAAGCATATCAAAAAGCG
GAGGAAACAGCCGGGGGAATATAACCCTTTAATTTAAAGAAAAGGGGGGGGAATTTAGGCCCC
CCGGGGGACCCCCGCCTTTGAAAATTTTTTAATAATTTCCCCGGGGGGGGGTGAAAAA
AAGGGGGGGGAAAACCTTTTTTCAAGGGGAGTTTTTTGGTGTCTGGGCCCCCTGGATAAAAA
CCCACAGGGTTGCGTAATGTGATGGGGAAATTTTCGAGATTCTCGGACTCTTTAAAAACACTTTG
AGCCCCACTATTTTCCCCGCCAAATTTCTGTTGGGGCATCTTTCGCCCGAAAGCCCCCTTA
TCCCCCCTTGCCCTCCCAAGGGCCCCCAGTGTTTTTTTTTACAGAGCCACCCCCCTTTTTT
TTTATGGGAGGAGTACGCCCCCTCCCTCTTTATTGCCCGGATGGGTAAAAACACTGCCGC

CTCGGGGGACCCAGGGGGGAAAGGAAAATTTTGTGCTTATGAAAAAGACCCCCCGCGCCG
TTTTTTTGTATTTAATATCCGCCA

***Metarhizium anisopliae* Mia-2.1**

Antisentido.

TATGGTACTACTCATCGAGTCACTATAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGC
TCCTGTTGCGAGTGTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTA
AGGGACGGCTGTGCTGGAAAACAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTT
GAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGT
TCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCAGAAG
ATACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTTGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAAC
AATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCACTCCGCAGTCA
CCCTACGGAAATATCCACTCCACCCTGTGAATTATACCTTTAAGTGTTCGTTTCGGGCGGGAGCT
TCGCGCCGCGGGGACCAAGCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTGCGGAGTGGTAAAGAATGAAT
CAAACTTTCAACACGGAATTTGTTCTGGCTTCGATTAACGCACGAATGCGGTAGTATGTGGA
TTGCAATCATGGATCATGCGATTTTTGACGCACATTGCGCCGTAGTATTCTGCGCATGCTGTGCG
AGCGTCATACCCCCATCACTTTGATAAGGTTGTGGGGAAGCGACGACATGGTTTTCTGCAGCC
ACTTTATTAATGGGTAGGCGTTGCCTCTCTGGTAGAGACTCGAACGGACCGAGGTCATGGCTTA
ACCAGTTTTATTTACCTGAACCGTGGAATATCCTACTAAGCGTAGTAGCCGGAGACAAC

***Metarhizium* sp Mia-3.1**

Sentido.

TGTATCACTACACGCTGCTGGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCG
GGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATC
GGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTC
CTCTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCC
CCAACTTTTATAGTTGACCTCTAATCAGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGC
GGAGGAA

***Metarhizium* sp Mia-3.1**

Antisentido

TAAATAACGTACTACTCATCGAGATCACTATAAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGC
CGGGCTCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATT
AATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAGAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGG
GACTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATG
TGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTC
AGAAGATACTTATTAATAAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCC GCCGAA
GCAACAATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGC
AGTCACCTACGGAAATTATCCACTCCAACCCTGTGAATTATATCTTTAATTGTTGCTTCGCGGG
ACTTCGCGCCGCGGGGACCGAACTTCTGAATTTTTATAAGTTCTGCTGGAGTGTTAGAAGATGA
ATCAAACTTTCACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAGACGCACGAATGCATAGTATGTG
ATGCAGATCATGAATCATCGATTTGAAGCACAATGCGCGTCAGTATTCTGCGCATGCTGTT CGA
GCGTCATACGCCCTCAGTCCTTGGACTGGTTAGGGATCGCAGCTGTTTCACACACCTCATAAAT
AATTGGTTCGTCGCTCTCTCTGCCGGATAGAAAATCACACGGAAACCGGGCGGTCATGTC

***Metarhizium* sp Mia-4.1**

Sentido

CGCGTGCTCTACTCATCGCGGTCACTATCATTAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGAGCGCGC
CGGGCTCCTGTTGCGAGTGTTTTAGTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGTCTATTA
ATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGG
AGTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGT
GCGTTCAGAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCCCTTCAGATTACTTATCGCATTTCGCTGCGT
TCTTCATCGATGCCCGAACCAAGACATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCACTC
ACAAGATACTTATTAATAAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCC GCCGAA
GCCACAATTAACGGGATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCG
CTGGTTCACCAACGGAGACCTTGAGAACGACTTTTACTTCCTCTAAATGGACCAGGA

***Metarhizium* sp Mia-4.1**

Antisentido

CGGCTAGCTCGCTGCTGACAGCGGTAGGACATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGA
ATTATACCTTTGATTGTTGCTTCGGCGGGAGTTCGCGCCC GCCGGGGACCCAGACCTTCTGAA
TTTTTTAAGAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCAATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGGCGAATTCAGTGA

ATCGTCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGC
GTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCTAGGCTGGTTTTCCA
ACAAAACCCATCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCTCAGTACTAAAAC
ACTCTTAACAGGAGACTCGGAGCGGTCCACTGACTTAAAACCCCCCAACTTTTTATAGTTGACC
TCGAATCAAGTAAGACTACCCAGGAGA ACTTAAGCATATCAAAGGCCAGGAA

Metarhizium sp Tac-1.1

Sentido

CGTTTATCACTCCACGCTGCTGGATCATACTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGC
CGGGGACCCAAACCTTCGGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCT
GGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGG
GATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGC
CCTCTCTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGAAAAC
CCCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAGCTTAAGCATATCAT
AAGCGGAGGAA

Metarhizium sp Tac-1.1

Antisentido

CACTCAGCTAACTACTGCATCGAGTCACTATAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGC
CGGGCTCCTGTTGCGAGTGTATACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTA
ATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGG
ACTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT
TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCCTC
AGAACATACTTATTAATAAAATTCAAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCAAGTCCCGCCGAA
ACAACAATTAAGGTATAATTACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGC
AGGTTACCTACGGAAGTTTTTATCGGGTCCGGGAATTAACCCGGGGATCCCTCTGTGGTGT
GGGGGGGGGGGACCCAGCGGGGAATTTTTAGGTTTTTGGGGTCAAAGGATGAAATCCAC
CGATCTTGGGACTGGGACTTAAAACGCAAAAGGAT

***Metarhizium* sp Tac-2.1**

Sentido

GCTAATCACTCACTCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGG
GACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGG
CGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCT
CTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC
AACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAACGGA
GGAAACAACGCTGGGAAATTAACCTTTAATTGTTGGCTTCGGCGGGACTTCCCGCCAGTCGG
GGGACCCGACCATCGGGATTTGTAGATAAGTATCTTCTCAAGCGCGTAGAAAAAAGAAATAAAA
AATTTTCAACATCGGAACTCTTGGTTCTTGGCCTCCGTAGACACAAACCCACAGCACATTGCG
TAAAGTGGATGGCTAATTGTCAGGAGTCCAGCGAAATCATTGGAAGACCTTTTTGGAGGCCAC
TTAGTTTCTCGTCGCATATCTGGTCGGGCATGATACGTTTGAAGAGCTCCTGACCCTTAATTC
GCGTGATGCTAAGAATGTGTGTGATAGACCCAACACTGTTATTATAGGAGATATCCTTCTGACTA
TAATAGCTAGTCGCAGATAGTCCCGCTCTGACAGGCCGGAAAGTAAAACAATGACGTAAAACAC
CCGCGTTTGCATTGACCTGAAACCGGCAGAATACGCCTTTAGAC

***Metarhizium* sp Tac-2.1**

Antisentido

CGTACTACTCATCGAGTCACTATAAGTTGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCC
TGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAAGG
GACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTGAG
GGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTCA
AAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCAGAAGATA
CTTATTAATAAATTCAGAAGTTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAACAAT
TAAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCAACC
TACGGAAATTGTCCACTCCCACCCCTGTGAATTATACCTTTAATGTTGCTCGGCGGGACTTCGC
GCCCGCCGGGACCAGCCTTCTGAATTTTTAATAGTATCTCTGAGTGTAAAGAAATGATCAAATTT
CACACGGACTTGGTCTGCATCGATAGACGCACGAATGCGATGAGTATGTGATGCACATCATGAT
CACGACCTTGACGCCACATGCGCGTCAGTATCTGCGCATGCTGTGAGCGTCATACCCCATCA
CCCCTGAACAGGTGTGGGAAGGCCAGCTTGTTTTCTCTCAACCATCTTACTTAATGGCGTTCCG

TGCCTCCCTCGCGTATGAACTCGACGACGACGTCATGGCTAACCCAGTTTAGTACCTGACGTG
ATCCGTACCTAAGCTTCGAGTAGCGAAA

***Metarhizium anisopliae* Tac-3.1**

Sentido

CAACATAATCTCTGATCGAGGTCACTATATTAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGAGCGCGCC
GGGCTCCTGTTGCGAGTGTTCCTACTACTGCGCACAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCTATTAA
TTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGA
GTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTG
CGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCCATTACACTTATCGCATTTTCGCTGCGTT
CTTCATCGATGCCCCAACAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCCTCAA
AAGATACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGC
ACAATTAACGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTG
GTTACCAACGGAGACCTTGTTACGAATTTACTTCCTCTAAATGGACCAGGA

***Metarhizium anisopliae* Tac-3.1**

Antisentido

CAGCGTGATCTACTGATCGCGTCAGTATCATTAGTTGAGGGGGTTTTACGGCACTGGAGCGCG
CCAGGCTCCTGTTGCGAGTGTTCCTACTACTGCGGCGAGCCGGGCCACGGCGAGACCGTCTATT
AATTAAGGGACGGCTGTGCTGGTGAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACTCCAAGTCCACACGG
GAGTTGATGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATG
TGC GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCCCTTACACTTATCGCATTTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCCCCTCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCCTCC
AAAGATACTTATTAATAAATTCATAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCCAACCTCCCGCCGAAG
CAACTATTAACGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCT
GGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGAATTTACTTCCTCTAAATGGACCAGGAA

***Metarhizium anisopliae* Tac-4.1**

Sentido

ATAATCACTCCACCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGGG
ACCCAAACCTTCTGCAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGG
CGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCT

CTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC
AACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTGAAGCATATCAATAAAC
CGGGAGGAAACACCCCTGGGAAATATTAACCTTTTAATGGTGGGTACGGGGGGCTTTCCCCC
GCCCGGGGGCCCCAGCCATCAGGAATTTTTTTAATAAGGTAATCTTCTTGAGGGGGCTAAGAAA
AGGAAAAAAACTTTTTTAACAATCGGAACCCCTTGGGTTTCTGGGGCTCGCGGGAAAAACACACC
CCCCGGACATGGGGTTAAGTTGAATGGGGGATATTTGCCGAGAGTGTCAGCGAAACCTTTC
CAAACCCCTTTGAAACGCCCCCAATCGGGGCCCCCTCCGGAATTTCCGGTGGGGGCGCTTA
GAATAGTTCCAGAGGTCTTTTATCTCCCCAAGAGTATTCCGCGGGAGCTG

***Metarhizium anisopliae* Tac-4.1**

Antisentido

CGTACTACTCATCGAGTCACTATAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCC
TGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAAGG
GACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTGAG
GGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTCA
AAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCCTCAGAAGATA
CTTATTAATAAATTGAGAAGTTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAACAAT
TAAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCCCC
TACGGAAATTATCCACTCCAACCCTGTGAATATACCTTTAATGTGCTCGGCGGGACTTCGCGCC
GCCGGGACCAAGCTTCTGAATTTTTATAGTATCTCTGAGTGTTAAAGAATGAATCAAACCTCACA
CGGACTGTGGTCTGCATCGATAAAACGCACGATGCGATAGTATGTGATGCACATCATGATCATC
GACTTTGACGCACATGCGCGTCAGTATTCTGCGCATGCTGTGAGCGTCATACGCCACTACGC
CTGGAGAGTGTTGGGGGATGACCGACTTGTTTTCTTCAAACCATCTTCACTATGCGTTCCCTG
CCTCTCTCGCATTGAACTCGCACGGACGGCGTTCATGCTAACCAGGTTAGTGTACGACGGTGA
ATCCTAATTAGCTAGTTAGCGGAGAA

***Metarhizium* sp Tac-5.1**

Sentido

CGACTCGCTGGTGACAGCGGAGGGACATTACCGAGTTATCCAACCTCCAACCCCTGTGAATTA
TACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT
TAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGGAACGCACATTGGGCCCCGTC AATTATTTGGGGGGGATTTGCTGGTTCGAGCG
TTATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCC

AGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAA
ACACTCGCAACAGGAGCCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCACTTTTTATAGTTGA
CCTCGAATCAGGTAGGACTACAGCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGGAGGAA

Metarhizium sp Tac-5.1

Antisentido

CCAAATCTACTGATCGAGGTCCTATAAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGG
CTCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTT
AAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACT
TGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCG
TTCAAAGATTCGATGATTCCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTT
CATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCCTCAGAA
GATACTTATTAATAAATTGAGAAGTTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAA
CAATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGT
TCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAATTGACCAAG

Metarhizium anisopliae Tac-6.1

Sentido

TCTATCACTCACCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGGA
CCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGC
ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCG
AGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCT
GCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCAA
CTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTGAGCATATCAATAAAGCG
GGAGGAAA

Metarhizium anisopliae Tac-6.1

Antisentido

GAATAACTACTCATCGAGATCACTATAAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGG
GCTCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATT
TAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGAC
TTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCG
GTTCAAAGATTCGATGATTCCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTC

TTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCACTCAG
AAGATACTTATTAATAAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGC
ACAATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAG
TCACCCTACGGAAATTGTCACTCCAACCCTGTGAATTATACTTTAATGGGTGCTCGGCGGGAGC
TTCGCGCCCGCCGGGGACCAACTTCTGATTTTTAATAAGTATCTCTGAGTGTTAAAGATGATCAAA
CTTTCACACGACTTTGTTCTGCATCGATAAACGCACGATGCGATAGTATGTGGATTGCAATCAT
GATCACGACTTTGACGCACATTGCGCCGTGAGTATTTCTGCGCATGCTGTTCCAGCGTCATACGC
CCACTAATCCTGGAAAGTGTGAGGGATCGACTATGTTTTCTCGCACCACTCCATACTTATTGC
GTCGCTGGCCTCCCTCGCTATAGAACTTCAACGGACCGCGTCATGGCTAACCACCCTTTGTTAC
CTGACGTGCATACGTGTACTTAGCATCTATCGGGGAGA

Beauveria bassiana Tac-1

Sentido

CGGGCAGCTCACTCCTACCTTCTGTGACTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCC
GGACGCGGACTGGACCAGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGA
ATACGCCGCAAGGCAAAACAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAAC
CCTCGACCTCCCCTGGGGGAGGTGCGCGTTGGGGACCGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA
TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCCGA
CGCGGCCACGCCGTAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCG
CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Beauveria bassiana Tac-1

Antisentido

AATTGCAGATCTACTGATCGAGGTCACGTTCAAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCGG
GGTTCCGGTGCGAGCTGTATTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCGCCACTCCATTTCC
AGGGCCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACCTCCCCAGGGGAGGTCGAGGGTTG
AAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATT
CGATGATTCACTGGATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGC
CAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGGCGCGTATTCAGAA
GATGCTGGAATACCAGAGTTTGAAGTCCCCGGCCGGCCCTGGTCCCGTCCGCCTCCCGGCC
GGGGCCAATCCCCCAAACCAATAGGTAGTTTCAAAAAGGGTTAGGAGAGTTGAAACAC
TCGATAAGAGAACCTCTCCGCAGGTTACCTACGAAAACGTACTTTGGTAGCTACGGCGGGAT
CTTCCGCGGAGGACCCGAAGGGACCGGAACGGGCGGGGGCCCCCAGGAGGGGGGGTGCA

GGTTCGGGGATACGGAATAGGGGGGGGAAAGGGGAATAATTTGCACACGGACCTGGGGCTGC
ATGGATAATAAGGGACGAATGCGGTAGTAGTGTGATGCGAACCGTGGATCACCAGCTGTGAAC
GCCATGGGGCCAGCCGGATCTGGCGGCAGCCGGTCAGGGTCATTGACCATGACCTCCTGGGG
GAACGTGGCTTTGGGGACCGCGCACACCGCCTGTCTGATTGGAGTGCGCCCTCGCGGAGCG
TCGTGCGTAGTATACGGCCTCGCACGGAGCACTGACGCGGCCGGCCTTAGACTCCAACGTCT
GGACCGTGACTCGTAACGGTTAACTACCCGCTGAACTTAGAAGCTTCAGTACGCGCGGAGGGA
AA

Metarhizium sp. Xoch-1.1

Sentido

CCTATAAATCACTCACCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCG
GGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATC
GGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTC
CTCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTA AACCC
CCGACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAACATATCATAAG
CCGGAGGAACTACCCTGGGAAATATAACCTTTAAATGGGTGGCTCGGGCGGGACTTCCC GCC
CGCCGGGGGGACCAGAAGCGTCTGAAATTTTTTATAAGTATCCTCCCGAACTGGGATAAAAA
AATGAAATCAAACTTTCTACCAAACGGATCTCTGGTTCTTGGCTCCGATAAAAAACGGCAACG
GAATTGGCGATAAGTGATGTCGAAATGTGCGAAATCAAGTGAATCAACGAGATCTTGGAGCGC
CAATTGGGTCTCGGTTGAGGATTTCTTGTGCGAGCATGACCGCTCAAGGCCTAATAGACCACTAA
GTCTCGTGAGAGCATAGCGTTGTGTGTAATGCGAACTAGTAATACATGAGCGAGCGTAACCTA
TTGGCGGTTGCGATGTCGCTGACGATGACTAA

Metarhizium sp. Xoch-1.1

Antisentido

TATAGTACTACTCATCGAGTCACTATAAGTCGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGC
TCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTA
AGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTT
GAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGT
TCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCCTCAGAAG
ATACTTATTA AAAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCC GCCGAAGCAAC

AATTAAGGTATAATTACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCATCCGCAGTCA
CCCCTACGGAAAGTTGCCACTCCCACCCCTGTGAATTATACCTTTAATGTTGCTTCGGGCGGGA
CTTCGCGCCGCGGGACCAAAGCCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTCTGAGTGGTTAAAGAAA
TGAATCAAACCTTTCAACAACGGAAGTGTGTTCTGCATCGATAAAACGCACGATGCGATAGTAAT
GTGAATGCAAATCATGAATCAGCGACTTGAACGCAATGCGCCGTCAGTATTCTGCCGCATGCTG
TCGAGCGTCATACGCCCACTTCGCTCCTAGAGACGTGTTGTGGAAGACCGACCATCGTTTTCT
GCAAACATCCTTAATATGGCGGTTTCGCTTGGCCTTCCTTGGCATATAAACTCGCACTGAGCCG
GCGTCATTGCTTAATCCCGACTATGTAACCTGAACGTGAATCCGTAACCTTAAGCCATCATACGG
AGAATC

***Metarhizium anisopliae* Xoch-2.1**

Sentido

GCTAAATCACTACACGCTGTGGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCC
GGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTGAGTATTCTG
GCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGA
TCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCC
TCCTCTGCGCAATAGTAAAACACTCGCGACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGAAAAACCC
CCCGACTGTTTTATAGTTGACCTCCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAAACTTGAAACATATC
AATAAGCCGAAGGAAACCCCGGGGAAATTACCCCTTAAATGGGGGGTTTTGGGGGGGAAT
TTCCGGCCGCTCGGGGTGCCAGGAACCTAAATTTTTGTTATTTTAGAATCTTCCGGAGCCGG
GATGGAAAAGGAAAGGAAAAACATTTTTAACAACCGCAACTTTTGGGTTTTCTGGGGCTCCGTAA
AAAAACACCCGAACGGGCGTTGCATAAGGGAAATGGGAAAAAGTCGGGAATTCACGGAATCA
TTCGAAAGCCCTTTGAGAGCCGCTTATTGTATCTCGGTGGGGATGCTCTGTTTCGGAGGGAATG
CTAACCCCCCAAAAAAC

***Metarhizium anisopliae* Xoch-2.1**

Antisentido

TATAGATACTACTCATCGAGTCACTATAAAGTCGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGG
GCTCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATT
TAAGGGACGGCTGTGCTGAAAACAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGAC
TTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGC
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTC
TTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCAG

AAGATACTTATTAATAAAAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGC
AACAAATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAG
TCACCCTACGGAAATATCAACTCCCAACCCTGTGAATTATACCTTTAATGTTGCTCGGCGGGGA
CTTCGCGCCGCGGGACCAAACCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTCTGAGTGTAAGAAATGAATCA
AACTTTCACACGACTTGTCTGCATCGATATACGCACGATGCGATAGTATGTGATGCAATCATGAT
CAGCGACTTTGACGCACATTGCGCGTCAGTTTTCTGCGCATGCCTGTCCAGGTCATACGCCAAT
ACTCCTGATACAGGTTGGGAAGACGAATTGTTTTCCGCCACCACCTTACTAATGGCCGTCGCCT
GCCTCTCGCATAGAACTTCACGGAACCGGCGGTGCATTGCTAATCCGACTTTGTATCTGAACG
TGATACTGACTGAGCTTAGTACGGGAGAA

Metarhizium sp Xoch-3.1

Sentido

CGCCGTGATCTACTGCATCGCGGTCACTATCATTAGTCGAGGGGGTTTTACGGCAGTGGAGCG
CGCCGGGCTCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCCAGACGTCTA
TTAATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAATACCAAGTCCACAG
GGGAGTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAA
TGTGCGTTCCAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCCCTTACATTACTTATCGCATTTTCGCTG
CGTTCTTCATCGATGCCCCAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCA
CTCAAACATACTTATTAATAAAAAATTCATAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCCAAGTCCCGACG
AAGCCACAATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCC
GCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGATAAGACTTTTTACTTCTCTAAATGACCAAGA

Metarhizium sp Xoch-3.1

Antisentido

TGCCTACTCGCTTGGTGACAGCGGAGGGACATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGA
ATTATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAAT
TTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTTTCCACAACGGATCTCTTGG
TTCTGGCATCCATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCCGAATTGCGTGAA
GGGGCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCAGCG
TCATTACCCCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCTAGGCTGGTTTTCCAG
CCCAGCCCTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCCTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAACA
CTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCGACTTTTTATAGTTGACGC
GCGAATCAGGTAGGACTACGCCGATGAACTTAAGCATATCATAGGCCGAGGAA

Metarhizium sp Xoch-4.1

Sentido

CAGCGCATCATCTCCTGCATCGAGTCACTATATAGTCGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCG
CCGGGCTCCTGTTGCGAGTGTCTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAAT
TAATTTAAGGGACGGCTGTGCTGAAAACAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGG
GGACTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAAT
GTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCCATTACATTACTTATCGCATTTCGCTGC
GTTCTTCATCGATGCCCGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCAC
TCCGAAGATACTTATTAATAAAATTCAGAAGGTTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCCGCC
AAGCCACAATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCC
GCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCAAGA

Metarhizium sp Xoch-4.1

Antisentido

CCTTAGCTCGACTGCTGACGCGGAGGACATTACCGAGTTATCCAACCTCCAACCCCTGTGAATT
ATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTTT
TTAAGAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC
ATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCA
AAGCCGTCCCTTAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTACTAAACACT
CGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGACGTAAAACCCCCGACTTTTTATAGTTGACCTCG
AATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCCGAGGA

Metarhizium anisopliae Xoch-5.1

Sentido

CGTAAATCACTCCACTCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCG
GGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATC
GGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTC
CTCTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAACCC
CCGACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGTAGGACTACCCGCTGAACTTGAAACATATCATAAC
CGGAGGAAAAGCCCTGTGAAATAATACCTTTAATTGGGGGCTTCGGGGGGACTTCTCCGCCGG

CGGGGGACCCAAGGCTTCTGACTTTTTATAAGTATCCTCTGGAGTGGGATAAGAAAAATGAATC
AATAACTTTCAACAACGGGACTCTTGGTGTGCATCGATTAAAAACGCGCATGCTGTGAGTAGT
GAAGTGCATAGGTGAAGATCATGGATCTATCGAAATCTATTGGACGCCGATAGTGTCTTGTCA
GTATGCCTGTGCGAGAATGCATGCTCCAAACGGCCATCAGCACTTGTGTTGACGAACCAGGCG
TGTGGTTACCGGACGACATCTGATATCAATGAGGCGTCCTTGGACTCATCGAGCGTATGGAAA
GTTGTTA

Metarhizium anisopliae Xoch-5.1

Antisentido

GGATAACTACTCATCGAGTCACTATAAGTCGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCT
CCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAA
GGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTG
AGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTT
CAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACTACTCAGAAG
ATACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAAC
AATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCA
CCCTACGGAAAATTTTGCCTCCACCCCTGTGAATTATACTTTAATGTTGCTCGGCGGGACTG
TCGCGGCCCGCCGGGACCAACGTTCTGAATTTTTATAAGTATCTCTGAGTGGTTAAAGAATGAAT
CAAACTTTCAACAACGGACTTGTCTGCATCGATAGAACGCACGATGCGATAGTATGTGGTTGC
AGATCAGTGAGTCATCGACTTTGACGCACATGCGCCGTCAGTATTCTGGCGGCATGCTGTTCA
GGCGTCATAACCCTCAATACCCGTGACTGGGTGTTGGGGATAGACAGACTGGTTTTTCTCCAA
CACCATAACTTAATGGCGTTTGCCTGCCTCCCTGCCATATGAAACCTCGCACGGACCGGCGTC
CATGCCTAAACCCCACTTTATGTACTCGAACGGGACATCCGTGAACTTAGCATCTGTAGGCGGA
GAGAA

Metarhizium robertsii Xoch-6.1

Sentido

CGGGATTGCTGCTGACAGCGGAGGGACATTACCGAGTTATCCAACCTCCAACCCCTGTGAAT
TATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
TTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC
ATTACGCCCTCAAGTCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCA
CAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAACACT

CGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCG
AATCATGTAGGACTACCCGCTGGAECTTAAGCATATCATAAGGCGGAGGA

Metarhizium robertsii Xoch-6.1

Antisentido

CGGTACTCGATTGCTGACAGCGGAGGATCATTACCGAGTTATCCACTCCCAACCCCTGTGAATT
ATACCTTTGATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGGGACCCAGACCTTCTGAATTT
TTTAAGAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTAGGT
TCTGGCATCAATGAAGAACGCACCGGAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCATAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCTAGGCTGGTTTTCCAAC
AAAACCTTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCACTACTAAAACAC
TCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGACGTAGAACCCCCCAACTTTATATAGTTGACCTC
GAATCAAGTAAGACTACCCGCTGAGCTTAACCATATCAAAGGCGGAGGAA

Metarhizium sp Xoch-7.1

Sentido

TCTATCACTCCACCCTGTGATTATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGG
GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCG
GCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCC
TCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC
CAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAGGACATATCAATAAA
GCGGAGGAAACCACCCTGGGAAATTAAGGTTATATTGGGGTAACGGGGGGGATTTCTGGG
GCCTCGGGGGGAACCGGGCCTCCGAAATTTTTTAAAAACCAACCCCCGGGAGGGGGAAAGAA
AAAAGAATGAAAAATTTTTTAAAAACCGGATCTCCTGGGGTCTGGGCTCCCTAAAAAAAAG
CGGAAATGAAAAGGAGTAAGTGTGATTGGGGAAATTCAAAAATTAGGGAATCCTTTGACACCC
ACTTGGGCCCCCCCTCCTGTACTCCCGGGCGGCCATTTCTGGTTTAGGCGTGATTTATCCCCC
CAAGAGCACCTCG

Metarhizium sp Xoch-7.1

Antisentido

CGTACTACTCATCGAGTCACTATAAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTC
CTGTTGCGAGTGTAAAACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAAG
GGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTGA
GGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACCACTCAGAAGAT
ACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAACAA
TTAAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCACC
CCTACGGAAAAGTAGCCACTCCCACCCCTGTGAATTATACCTTTAATGTTGCTCGGCGGGGCTT
CGCGCCGCGGGGACCAAGCTTCTGAGTTTTTATAGTATCTCTGAGTGTTAAAGAATGAATCAAA
CTTTCAACAACGGAACCTTGTCTGCATCGATAAAAGCACGATGCGATAGTATGTGATGCAATCAT
GAATCAGCGACTTTGACGCACATGCGCCGTCAGTATCTGGCGCATGCTGTGAGCGTCATACC
CCCATCACTCCCTGACACTTGTGTTGGGAGAGCCAACATTGTTTTCTCTGCAACCATCCTAACT
TATTGGAGATTCGCTGCCTTCTCTCGCGGTAGGAACTTGCACGGACGGAGGGTCCATTGCT
AACCCAGTTTAGTACTCGGAACCGTGAATCGCTTAAGTACTGAGTGCAGTAACGGAAGAAT

Metarhizium sp Xoch-8.1

Sentido

TCTAATCAACTCACCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGG
GACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTTGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGG
CGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCT
CTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAACCCCTCCT
GACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAGAAGTGAACATATCAATAAA
GCGGAGGAAACGCCCGGGGAAATATTACCTTTAATTTGTGGCTTAGGGGGGGACTTCCCGCCC
CCGAGGGGAACCCACCCCTCTCAAAATTTTTTAATTAATAACCTCCTCGAGTGGGTAAAAAAA
AGGAATTAACCTTTTTCTCCCCCGCAGCCTTTGGGGTTCTGGGCATTCTTAAAAAAA
CGCCCGCAAAGTGTGATTAAGTTGGGGGTGGAAATAGACAAGAGAATCCATGAAACCTTTTA
AAACCCCTTTGACCCCTTTGTGGTTCCCGTCGGGGATTTCTGGTTGGGCGGGCTTTGCT
CCTCCAAGGCGCTTTTTGCCCTCTGGGTGGAGGGGAGGCAGGGAGTCTGTTGTATTTGGAC
AAGCCCAACAATATTATTTTATATTGCGAGGTTCCCCCTTTTGTCTTCAATTTGTGGGGTGAT

GGTTTGTGAAGAAGGGAGCAACCCTCCTTGGGGGCCCCCCCCCGAGAGGGAGGGCACACACC
TGCTTCGCT

Metarhizium sp Xoch-8.1

Antisentido

CCATACTACTCATCGAGTCACTATAAGTCGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTC
CTGTTGCGAGTGTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAAG
GGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTGA
GGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCAGAAGAT
ACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAACAA
TTAAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCCCC
CTACGGAAAGTATGCAACTCCCACCCCTGGTGAATTATACCTTTAATGTTGCTCGGCGGGACGT
TCGGCGCCCGCCGGGACCAACCTTCTGAGATTTTTAATAAGTATCTCCTGAGTGGGTAAAGAA
TGAATCAAACCTTTCAACAACGGACCTGTGTCCTGGCATCGATAAACGCAGCGAATGCGATAGT
ATGTGGATGCAGACTCAGTGATCCACCGACCTTGACGCCACATGCGCCCGTCAGTATTCTGCG
CATGCCTGTGAGCGTTCATACCCCCCATCAGCCCTCCTTGAAGTGGTGGGGATAGACCG
AACATGTTTTCCGCCAACCCACCCCTTAACCTAAATGGGCGGTCTCGCCCCTGCCCTCCCCTC
GCCGCATAGTAAACCTCGCCACGGAGCCCGCCGTTCCATGCTTAACCCCGACGTTAGGTGAA
CCTCGAACCGTGCTGCCGTACTAAGCGCTCATACGGAGA

Metarhizium sp Xoch-9.1

Sentido

TCTTAATCACTCACCTGTGATTATACCTTTATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGG
GACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAATGAATCAAACCTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGG
CGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCT
CTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAACCCCCC
GACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTGAAGCATATCATAACG
GAGGAAGTCGCTGGTGAATTATACGTTTAATGGTGGCTCGCGGGGACTTCAAAGCCCGCTCGC
GGACCAACCTTCTGAACTTTCTATGAGTAATCTTCCTCAGTGAGGTAGAAAAATGAATCAAACCC
TTCCACCACGGATAGTCTGGTTCTGGCATTGTATAACAACCCCGTAATGCGGTAGTAAGGT

GAAATGCAAAGTTTTCATGGATTCATCGAAATCTTTTGACGCCATGGTTCTGTCAGATTTCTTGT
CGCATGCTACTCCAGAGCGTCCTAACCTCATAGTTCCTCGAGACGTGATTATGGTGGATACGG
CACGCCACTGTATATATGAGTTCAGCCCTTGCCACTTTATTGACCGAATTGAAACGTTCTACCAC
TCCCGAGTACCACCGT

Metarhizium sp Xoch-9.1

Antisentido

TATCGTACTACTCATCGAGTCACTATAAGTCGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGC
TCCTGTTGCGAGTGTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTA
AGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTT
GAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGGCGCAATGTGCGT
TCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACTACTCAGAAG
ATACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCCCGCCGAAGCAAC
AATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCC
CCCTACGGAAAAGTTATGCACTTCCCACCCCTGTGAATTATACCTTTAATGTTGCTCGCGGGAC
GTTGCGCGCCGCGGGTACCAAACCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTCTGAGTGGTTAAAGAAT
GAATCAAACTTTCAACAACGGACTGTGGTTCTGCATCGATAAGACGCACGATGCGATAGTATGT
GATTGCAAATCATGGATCACGACTTGACGCAATGCGCCGTCAGTATTTCTGGCGCATGCTGTTC
GAGCGTCATAACGCTCAATACACCTCCTGGAATGAGTGTGGAAGCAAGACTAGGTTTTCTCCAC
CACTACCTTATATAATTGGCGTTTTGCTGCTTCCCCGCAATGAAAACCTTCGCACGGAACCGCGG
TCATTGCGGTAATCCCGACTTGTAGCGAACGTGATCCCGTTACTAGCTAAGTACGGAGATG

Anexo E. Resultados de la Identificación molecular de los aislados.

Metarhizium sp Cuj-1.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	896	896	54%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain SBTMa-001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and i	893	893	55%	0.0	98%	KF766520.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	891	891	53%	0.0	99%	FJ177505.1

Metarhizium sp Cuj-1.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain SBTMa-001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and i	893	893	55%	0.0	98%	KF766520.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain RZU-10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comp	891	891	53%	0.0	99%	KM117232.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	891	891	53%	0.0	99%	FJ177485.1

Metarhizium sp Cuj-2.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	907	907	62%	0.0	99%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	907	907	62%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	907	907	62%	0.0	99%	FJ589644.1

Metarhizium sp Cuj-2.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Cordyceps japonica strain IFO 9647 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal	891	891	51%	0.0	99%	AY245645.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	891	891	51%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	885	885	50%	0.0	99%	FJ177505.1

Metarhizium sp Cuj-3.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	671	671	96%	0.0	89%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	671	671	96%	0.0	89%	FJ545325.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLHN3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	671	671	96%	0.0	89%	FJ545323.1

Metarhizium sp Cuj-3.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	913	913	96%	0.0	97%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	907	907	95%	0.0	97%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	907	907	95%	0.0	97%	KC355181.1

Metarhizium sp Cuj-4.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A97 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	905	905	58%	0.0	99%	KC355179.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	902	902	59%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	902	902	59%	0.0	99%	FJ589644.1

Metarhizium sp Cuj-4.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CG32 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complet	141	141	50%	1e-29	76%	KF056843.1
--------------------------	--	-----	-----	-----	-------	-----	----------------------------

Metarhizium anisopliae Cuj-5.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	902	902	50%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	902	902	50%	0.0	99%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	902	902	50%	0.0	99%	FJ545325.1

Metarhizium anisopliae sp Cuj-5.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	889	889	56%	0.0	98%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interr	885	885	55%	0.0	99%	FJ177505.1

Metarhizium sp Mag-1.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	837	837	97%	0.0	94%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	837	837	97%	0.0	94%	FJ545325.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLHN3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	837	837	97%	0.0	94%	FJ545323.1

Metarhizium sp Mag-1.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	821	821	96%	0.0	95%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	821	821	96%	0.0	95%	KC355181.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	821	821	96%	0.0	95%	KC355180.1

Metarhizium anisopliae Mia-1.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	907	907	62%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	907	907	62%	0.0	99%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	907	907	62%	0.0	99%	FJ545325.1

***Metarhizium anisopliae* Mia-1.1**

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Cordyceps japonica strain IFO 9647 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal	891	891	52%	0.0	99%	AY245645.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	891	891	52%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comp	887	887	51%	0.0	99%	JN379352.1

***Metarhizium anisopliae* Mia-2.1**

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	909	909	48%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	909	909	48%	0.0	99%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern;	909	909	48%	0.0	99%	FJ545325.1

***Metarhizium anisopliae* Mia-2.1**

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	885	885	51%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comp	881	881	51%	0.0	99%	JN379352.1

***Metarhizium* sp Mia-3.1**

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac	904	904	97%	0.0	99%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac	904	904	97%	0.0	99%	KC355181.1

***Metarhizium* sp Mia-3.1**

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	896	896	56%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain RZU-10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe	891	891	56%	0.0	98%	KM117232.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib	891	891	56%	0.0	98%	FJ177505.1

***Metarhizium* sp Mia-4.1**

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc	872	872	96%	0.0	96%	FJ589647.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc	872	872	96%	0.0	96%	FJ589646.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc	872	872	96%	0.0	96%	FJ589645.1

Metarhizium sp Mia-4.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	809	809	96%	0.0	93%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	804	804	95%	0.0	94%	KC355183.1
1 <input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	804	804	95%	0.0	94%	KC355181.1

Metarhizium sp Tac-1.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	887	887	96%	0.0	98%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	887	887	96%	0.0	98%	KC355181.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	887	887	96%	0.0	98%	FJ589648.1

Metarhizium sp Tac-1.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	880	880	73%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium pingshaense strain COM132 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	872	872	73%	0.0	99%	JF827149.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	872	872	75%	0.0	98%	FJ177505.1

Metarhizium anisopliae Tac-2.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	904	904	50%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	904	904	50%	0.0	99%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	904	904	50%	0.0	99%	FJ545325.1

Metarhizium anisopliae Tac-2.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	891	891	53%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete	887	887	53%	0.0	99%	JN379352.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	885	885	53%	0.0	99%	FJ177505.1

Metarhizium anisopliae Tac-3.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	924	924	97%	0.0	97%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	924	924	97%	0.0	97%	FJ545325.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLHN3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	924	924	97%	0.0	97%	FJ545323.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLAN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	924	924	97%	0.0	97%	FJ545321.1

Metarhizium anisopliae Tac-3.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	795	795	93%	0.0	94%	FJ589647.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	795	795	93%	0.0	94%	FJ589646.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	795	795	93%	0.0	94%	FJ589645.1

Metarhizium anisopliae Tac-4.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain SHB1-2i 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	904	904	57%	0.0	99%	AY387575.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	900	900	57%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	900	900	57%	0.0	99%	FJ589644.1

Metarhizium anisopliae Tac-4.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	891	891	53%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comp	887	887	53%	0.0	99%	JN379352.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	885	885	53%	0.0	99%	FJ177505.1

Metarhizium sp Tac-5.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac	911	911	98%	0.0	96%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac	905	905	98%	0.0	96%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac	905	905	98%	0.0	96%	KC355181.1

Metarhizium sp Tac-5.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial seque	983	983	98%	0.0	99%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial seque	983	983	98%	0.0	99%	FJ545325.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLHN3 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	983	983	98%	0.0	99%	FJ545323.1

Metarhizium anisopliae Tac-6.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain SHB1-2i 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	913	913	97%	0.0	99%	AY387575.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	909	909	97%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	909	909	97%	0.0	99%	FJ589644.1

***Metarhizium anisopliae* Tac-6.1**

Antisentido

<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	891	891	52%	0.0	99%	AJ608970.1
<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comp	887	887	52%	0.0	99%	JN379352.1
<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae isolate KTU-27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	885	885	52%	0.0	99%	FJ177505.1

***Beauveria bassiana* Tac-1**

Sentido

<input type="checkbox"/> Beauveria bassiana isolate BbTDG 001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	957	957	98%	0.0	99%	HQ222972.1
<input type="checkbox"/> Beauveria bassiana isolate BbME 012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	950	950	98%	0.0	99%	HQ222980.1
<input type="checkbox"/> Beauveria bassiana voucher TSJBB 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	946	946	96%	0.0	99%	KF937310.1

***Beauveria bassiana* Tac-1**

Antisentido.

<input type="checkbox"/> Beauveria bassiana isolate 1572 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	817	817	52%	0.0	95%	JQ861946.1
<input type="checkbox"/> Beauveria bassiana isolate 1573 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	815	815	52%	0.0	95%	JQ861947.1
<input type="checkbox"/> Beauveria bassiana isolate Bb 9005 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	815	815	52%	0.0	95%	AY334536.1

***Metarhizium* sp Xoch-1.1**

Sentido.

<input type="checkbox"/> Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	896	896	54%	0.0	99%	KC355180.1
<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	896	896	54%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	896	896	54%	0.0	99%	FJ589644.1

***Metarhizium* sp Xoch-1.1**

Antisentido

<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comple	887	887	50%	0.0	99%	JN379352.1
<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae isolate KTU-26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interr	885	885	52%	0.0	98%	FJ177485.1
<input type="checkbox"/> Metarhizium sp. DOK 261 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribe	876	876	49%	0.0	99%	HQ331461.1

***Metarhizium anisopliae* Xoch-2.1**

Sentido

<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	856	856	60%	0.0	97%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae isolate CNXJ6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	856	856	60%	0.0	97%	FJ589647.1
<input type="checkbox"/> Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	856	856	60%	0.0	97%	FJ589644.1

Metarhizium anisopliae Xoch-2.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	896	896	53%	0.0	99%	FJ177485.1
<input type="checkbox"/>	Cordyceps japonica strain IFO 9647 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal	891	891	54%	0.0	98%	AY245645.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	891	891	54%	0.0	98%	AJ608970.1

Metarhizium sp Xoch-3.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	861	861	96%	0.0	95%	FJ589645.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	861	861	96%	0.0	95%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	861	861	96%	0.0	95%	FJ545325.1

Metarhizium sp Xoch-3.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	878	878	98%	0.0	95%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	878	878	98%	0.0	95%	KC355181.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	878	878	98%	0.0	95%	KC355180.1

Metarhizium sp Xoch-4.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	946	946	95%	0.0	98%	FJ589646.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	946	946	96%	0.0	98%	FJ589645.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	946	946	95%	0.0	98%	FJ589644.1

Metarhizium sp Xoch-4.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	952	952	96%	0.0	98%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	944	944	96%	0.0	98%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	944	944	96%	0.0	98%	KC355181.1

Metarhizium anisopliae Xoch-5.1

Sentido.

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	887	887	56%	0.0	98%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	887	887	56%	0.0	98%	FJ589644.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate NLWN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	887	887	56%	0.0	98%	FJ545325.1

Metarhizium anisopliae Xoch-5.1

Antisentido.

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	889	889	51%	0.0	99%	FJ177485.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comp	885	885	50%	0.0	99%	JN379352.1
<input type="checkbox"/>	Cordyceps japonica strain IFO 9647 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal	885	885	51%	0.0	99%	AY245645.1

Metarhizium robertsii Xoch-6.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	983	983	97%	0.0	99%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed	977	977	97%	0.0	99%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	977	977	97%	0.0	99%	KC355181.1

Metarhizium robertsii Xoch-6.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	983	983	97%	0.0	99%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed	977	977	97%	0.0	99%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	977	977	97%	0.0	99%	KC355181.1

Metarhizium sp Xoch-7.1

Sentido.

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	917	917	60%	0.0	99%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	917	917	60%	0.0	99%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	917	917	60%	0.0	99%	FJ589644.1

Metarhizium sp Xoch-7.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, compl	894	894	51%	0.0	99%	JN379352.1
<input type="checkbox"/>	Cordyceps japonica strain IFO 9647 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal	893	893	53%	0.0	98%	AY245645.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate GFI 101	893	893	53%	0.0	98%	AJ608970.1

Metarhizium sp Xoch-8.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	887	887	49%	0.0	98%	KC355180.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	887	887	49%	0.0	98%	FJ589648.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	887	887	49%	0.0	98%	FJ589644.1

Metarhizium sp Xoch-8.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	889	889	49%	0.0	99%	FJ177485.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comp	885	885	49%	0.0	99%	JN379352.1
<input type="checkbox"/>	Cordyceps japonica strain IFO 9647 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal	885	885	49%	0.0	99%	AY245645.1

Metarhizium sp Xoch-9.1

Sentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	898	898	55%	0.0	99%	KC355183.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii strain A99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	898	898	55%	0.0	99%	KC355181.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate CNXJ7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	898	898	55%	0.0	99%	FJ589648.1

Metarhizium sp Xoch-9.1

Antisentido

<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae isolate KTU-26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	889	889	51%	0.0	99%	FJ177485.1
<input type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae strain JZC175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comp	885	885	51%	0.0	99%	JN379352.1
<input type="checkbox"/>	Cordyceps japonica strain IFO 9647 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal	885	885	51%	0.0	99%	AY245645.1

Anexo F. Certificado de depósito de las cepas en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.



DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria
Subdirección de Control Biológico

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón".

Nº de Oficio B00.01.04.02.-057/2015

Tecomán, Col., 19 de Marzo del 2015

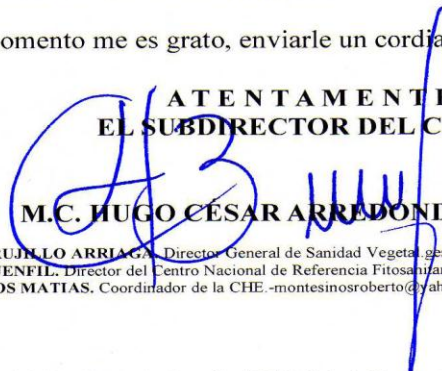
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Del. Iztapalapa
C.P. 09340 México, D.F.
loera@xanum.uam.mx

En atención a su solicitud de servicio de Depósito de Hongos Entomopatógenos (HE) en la Colección Hongos Entomopatógenos (CHE) del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en la modalidad de acceso libre, a través de la presente se **Certifica el depósito** en la CHE-CNRCB de veintidós aislados multiespóricos y diecisiete monoespóricos de (HE) que se detallan en el Anexo 1 y 2 de este documento.

Los hongos mencionados que fueron aislados de zonas agrícolas del Distrito Federal se analizaron por morfología colonial, viabilidad, esporulación y morfología de conidios; para evaluar estas características los HE se cultivaron en medio Sabouraud Dextrosa Agar suplementado con extracto de Levadura al 1%. Las especies descritas en el formulario de depósito corresponden a la micro-morfología que se muestra en los Anexos 1 y 2 del presente documento. El material biológico está resguardado en crioconservación a -70 °C y -196°C.

La CHE del CNRCB se compromete a: mantener viable el material biológico depositado y libre de contaminantes. El depositante, quien podrá disponer del material biológico depositado previa solicitud, acepta que la CHE del SENASICA es un sitio de resguardo de la diversidad genética de HE de México y proveedor de material biológico, por lo que podrá distribuir los hongos depositados para fines académicos, desarrollo de proyectos de investigación sin fines de lucro, o para su evaluación o aplicación masiva en caso de resultar de interés por la Dirección General de Sanidad Vegetal, como una alternativa para el manejo de poblaciones de plagas agrícolas. Los asuntos que no hayan sido señalados en el presente documento, serán expresados mediante documento oficial de ambas partes.

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

ATENTAMENTE
EL SUBDIRECTOR DEL CNRCB

M.C. HUGO CÉSAR ARREDONDO BERNAL



C.c.e.p. **DR. FRANCISCO JAVIER TRUJILLO ARRIAGA**, Director General de Sanidad Vegetal, gestión.dgsv@senasica.gob.mx
M.C. JOSÉ ABEL LÓPEZ BUENFIL, Director del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, abel.lopez@senasica.gob.mx
DR. ROBERTO MONTESINOS MATIAS, Coordinador de la CHE, montesinosroberto@yahoo.com.mx
HCAB*RMM*avv

Km. 1.5 Carr. Tecomán- Estación FFCC, Colonia Tepeyac, 28110, Tecomán, Colima
Tel. +52 (313) 324 07 45, ext. RED 52966, www.senasica.gob.mx