

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Hongos Asociados a Larvas de Insectos del Orden Lepidoptera en Algodón GM

Por:

ROBERTO DE JESÚS HERNÁNDEZ ROBLES

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Hongos Asociados a Larvas de Insectos del Orden Lepidoptera en Algodón GM

Por

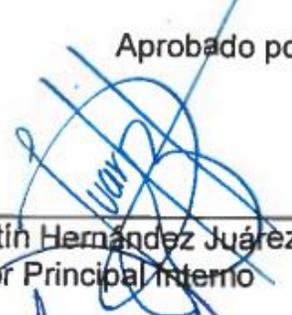
ROBERTO DE JESÚS HERNÁNDEZ ROBLES

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

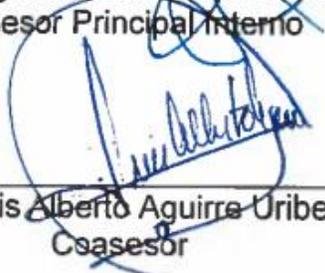
Aprobado por el Comité de Asesoría:



Dr. Agustín Hernández Juárez
Asesor Principal Interno



Dra. Miriam Sánchez Vega
Asesor Principal Externo



Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Coasesor



Dr. Epifanio Castro del Angel
Coasesor



Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo, 2022

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar el autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Roberto de Jesús Hernández
Robles

Asesor



Dr. Agustín Hernández
Juárez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la paciencia, sabiduría y fuerza que me ha brindado, ya que esto ha impulsado mi deseo de progresar y acto seguido me ha permitido llegar hasta este punto de mi vida. Agradezco las bendiciones que en todo momento siempre me ha estado otorgando y por haber puesto en mi camino a las personas adecuadas para así llegar a lograr esta meta.

A mis padres Roberto Hernández Castañón y Ma. del Carmen Robles López, por siempre estar al pendiente de mí, por todo el cariño y principalmente el apoyo incondicional que me han brindado, no solo durante esta etapa, si no, durante toda mi vida. Agradezco todo su sacrificio durante toda formación profesional para permitirme lograr este gran sueño que compartimos.

A mis hermanas y hermano y a toda mi familia por siempre estar en mi vida y buscar siempre la manera de brindarme todo su apoyo en cualquier momento que lo necesité.

A mi asesora principal externa, la Dra. Miriam Sánchez Vega por su paciencia y dedicación al momento de realizar las revisiones de este trabajo de investigación y, sobre todo, el apoyo y motivación brindados para la elaboración de este mismo.

A mi tutor el M.C. Víctor Manuel Sánchez Valdez quien, en todo momento desde primer semestre hasta lograr culminar esta etapa de mi vida, me brindó su apoyo y consejos para lograr salir adelante y lograr formarme como profesionista.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi querida Alma Mater por brindarme todo su apoyo y abrirme sus puertas, donde he adquirido educación y alimentación. Gracias por darme la oportunidad de forjarme como profesionista para enfrentar y solucionar problemas que se presenten durante mi vida laboral.

A mis demás profesores quienes aportaron de sus conocimientos a lo largo de toda mi vida académica, de tal manera que me ayudaron a lograr salir adelante.

A mis compañeros de generación y a mis amigos, en particular a Juan Ignacio Rivera Álvarez, Miguel Arias Yépez y Manuel Tafoya Díaz, quienes siempre me brindaron todo su apoyo y consejos en todo momento para que lograra salir adelante. Reconozco que son de las amistades más sinceras que alguien pueda tener, siempre los llevare conmigo y todos esos gratos y bellos recuerdos que lograron formar durante esta bonita etapa de mi vida.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, en especial al Programa Nacional de Investigadoras e Investigadores por México, anteriormente Cátedras CONACYT, ya que el desarrollo de esta investigación se deriva del Proyecto 1043: “Monitoreo de insectos resistentes a las toxinas Cry de Bt”.

DEDICATORIA

Principalmente a mis padres, quienes siempre me han brindado toda su confianza, cariño y por otorgarme su apoyo, por los sacrificios que realizaron para que yo, hoy en día me encuentre muy bien y culminando esta etapa de mi vida, por ello quiero hacer una dedicación de este presente trabajo, para demostrar lo agradecido que estoy con ellos y por todo lo bueno que siempre me han brindado hasta la fecha.

A todos mis profesores y principalmente a mi asesora principal externa, quien realmente se merece un gran espacio en este apartado, ya que por medio de su motivación y apoyo me permitió seguir adelante para la realización y culminación de este trabajo.

Quiero dedicarles también, esté presente trabajo a todos aquellos quienes siempre mantuvieron su confianza y fe, para permitirme lograr llegar a donde me encuentro hoy en día.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE DE CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo general.....	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner)	4
2.1.1. Mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	4
2.1.2. Cultivos genéticamente mejorados con Bt.....	5
2.1.3. Resistencia de lepidópteros a cultivos Bt.....	6
2.2. Microorganismos Entomopatógenos	8
2.2.1. Bacterias entomopatógenas	9
2.2.2. Protozoarios entomopatógenos.....	10
2.2.3. Virus entomopatógenos	11
2.2.4. Nematodos entomopatógenos.....	12
2.2.5. Hongos entomopatógenos.....	13
2.3. <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo).....	19
2.4. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff)	21

2.5. <i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimm)	23
2.6. <i>Isaria fumosorosea</i> (Wize).....	25
2.7. Asociación de lepidópteros como vectores de fitopatógenos	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Colecta de larvas en el cultivo de algodón y maíz Bt	29
3.2. Selección de larvas	30
3.3. Obtención de cepas fúngicas	31
3.4. Aislamiento de patógenos	34
3.5. Purificación y re-aislamientos de hongos	34
3.6. Aislamiento de hongos en larvas sometidas a cría	35
3.7. Identificación morfológica de los aislamientos de hongos.....	35
3.8. Identificación molecular de las cepas.....	37
3.9. Evaluación.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1.1. <i>Aspergillus flavus</i> (Link).....	41
4.1.2. <i>Aspergillus niger</i> (Tieghem).....	44
4.1.3. <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg (=moniliforme)	47
4.1.4. <i>Penicillium desciscens</i> (Oudem)	51
4.1.5. <i>Byssochlamys spectabilis</i> (Udagawa & Shoji Suzuki)	52
4.1.6. <i>Trichosporon asahii</i> (Akagi).....	55
V. CONCLUSIONES.....	58
VI. LITERATURA CITADA	59
VII. ANEXOS.....	71
7.1. Anexo 1	71

7.2. Anexo 2	72
7.3. Anexo 3	73
7.3. Anexo 4	74
7.4. Anexo 5	75
7.5. Anexo 6	76
7.6. Anexo 7	77
7.7. Anexo 8	78
7.8. Anexo 9	79
7.9. Anexo 10	80
7.10. Anexo 11	81
7.11. Anexo 12	82

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica determinada para seis cepas de hongos aislados de larvas de lepidópteros colectadas en la región de La Comarca Lagunera, México.....	40
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos (Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014).	18
Figura 2. Estructuras del hongo <i>Beauveria bassiana</i> (Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014).....	20
Figura 3. Crecimiento del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en un hospedero (Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014).	21
Figura 4. Crecimiento del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en medio de cultivo (Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014).	21
Figura 5. Estructuras del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> . a) Conidióforos. b) Conidios (Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014).	22
Figura 6. Crecimiento del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> en insecto hospedero (Fuente: Vázquez, 2019b).	23
Figura 7. Crecimiento del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> en medio de cultivo (Fuente: Anónimo, 2016).	23
Figura 8. Estructuras del hongo <i>Lecanicillium lecanii</i> . a) Conidióforos. b) Conidios (Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014).	24
Figura 9. Crecimiento del hongo <i>Lecanicillium lecanii</i> en medio de cultivo (Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014).	25
Figura 10. Crecimiento del hongo <i>Lecanicillium lecanii</i> en un insecto hospedero (Fuente: Micsa, 2018).	25
Figura 11. Estructuras del hongo <i>Isaria fumosorosea</i> . a) Conidióforos. b) Conidios. Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014.....	26
Figura 12. Crecimiento del hongo <i>Isaria fumosorosea</i> en un hospedero (Fuente: MICSA, 2018).	27
Figura 13. Crecimiento del hongo <i>Isaria fumosorosea</i> en medio de cultivo (Fuente: Gómez <i>et al.</i> , 2014).	27
Figura 14. Selección y almacenamiento de larvas.	31
Figura 15. desinfección de larvas.....	32

Figura 16. Larvas en cámara húmeda. A) Larvas recién colocadas. B) Larvas después de tres días de reposo.....	32
Figura 17. Larvas en PDA.....	33
Figura 18. Estructuras reproductivas de <i>Aspergillus flavus</i> . A) Conidias. B) Fiálides. C) Vesícula. D) conidióforo. Imagen observada al microscopio a 10X.	42
Figura 19. Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri.	43
Figura 20. Estructuras reproductivas de <i>Aspergillus niger</i> . A) Conidióforo. B) Vesícula + conidios. Imagen observada al microscopio a 10X.	45
Figura 21. Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri.	46
Figura 22. Estructuras reproductivas de <i>Fusarium verticillioides</i> . A) Conidióforo (vista a 10X). B) Falsa cabeza de conidios (vista a 10X). C) Macroconidia (vista a 40X). D) Microconidia con un septo (vista a 40X). E) Microconidia sin septos (vista a 40X).....	48
Figura 23. Crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Reverso de la caja petri.	49
Figura 24. Estructuras reproductivas de <i>Penicillium desciscens</i> . A) Conidióforo. B) Métulas. C) Esterigmas. D) Cadenas de conidios. Imagen observada al microscopio a 10X.	51
Figura 25. Crecimiento de <i>Penicillium desciscens</i> en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri.....	52
Figura 26. Estructuras reproductivas de <i>Byssosclamyces spectabilis</i> . A) Clamidospora. B) Pseudohifa. C) Conidioforos. D) Conidios. Imagen observada al microscopio a 10X.....	53

Figura 27. Crecimiento de *Byssochlamys spectabilis* en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri. 54

Figura 28. Estructuras de *Trichosporon asahii*. A) Blastosporas. B) Artrosporas. C) Clamidosporas. D) Pseudohifa. E) Hifa. Imagen observada al microscopio a 10X. 55

Figura 29. Crecimiento de *Trichosporon asahii* en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri. 56

RESUMEN

Los cultivos Genéticamente Modificados (GM) con la inserción de *Bacillus thuringiensis* (Bt) han sido de suma importancia en las últimas décadas, esto debido a la capacidad de poder expresar en sus tejidos las proteínas Cry, las cuales presentan un efecto insecticida para determinados insectos. En este trabajo de investigación se recolectaron larvas de insectos del orden Lepidoptera a partir del cultivo de algodón GM con Bt y cultivos aledaños que interaccionan con la tecnología, como el maíz y sorgo escobero. Estas larvas fueron trasladadas al Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, con el propósito de colocarlas en cámaras húmedas y posteriormente realizar aislamientos, principalmente de hongos que podrían comportarse como entomopatógenos para estas mismas. Los hongos que fueron aislados e identificados fueron *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium desciscens*, *Byssochlamys spectabilis* y *Trichosporon asahii*, donde *A. flavus*, *A. niger* y *F. verticillioides* tienen el potencial de ser patógenos para larvas de lepidópteros según la literatura, con esto se puede demostrar que los cultivos GM con Bt no llegan a afectar el comportamiento de los hongos entomopatógenos. En cuanto a los hongos *P. desciscens*, *B. spectabilis* y *T. asahii* no existe ningún reporte hasta la fecha sobre estos mismos comportándose como patógenos de insectos, por lo que este trabajo los reporta por primera vez como entomopatógenos de larvas de lepidópteros.

Palabras clave: Cultivos GM, *Bacillus thuringiensis*, lepidópteros, hongos, entomopatógeno.

I. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner (Bacillales: Bacillaceae), es una bacteria que habita en los suelos, la cual tiene forma de bacilo, es Gram positiva y aerobio facultativa, posee flagelos en toda su superficie y su tamaño oscila entre 1 a 1.2 micrómetros de ancho y de 3 a 5 micrómetros de largo. Durante su fase de esporulación esta bacteria genera un cristal, el cual está conformado de proteínas Cry, las cuales presentan toxicidad a larvas de ciertos insectos, entre los cuales se encuentran lepidópteros, dípteros, coleópteros, hemípteros y algunos nematodos (Portela *et al.*, 2013).

Los cultivos Bt son plantas que han sido modificadas mediante ingeniería genética, para brindar protección a ciertas plagas a través de la expresión, en sus tejidos, de proteínas insecticidas denominadas proteínas Cry, las cuales provienen de la bacteria *B. thuringiensis* (M.R.I., 2017).

De acuerdo a la revisión de Tabashnik *et al.* (2013), “de las 13 especies de plaga blanco más importantes de los cultivos Bt adoptados en todo el mundo desde 1996, siguiendo el criterio de aumento de frecuencia de alelos de resistencia a campo y daños económicos, se ha detectado resistencia en algunas poblaciones de cinco especies (tres de maíz y dos de algodón)”. La tasa de detección de resistencia se incrementó desde 2006, probablemente como consecuencia del incremento del área sembrada con cultivos Bt, el aumento del número de poblaciones expuestas, la exposición acumulada de las plagas a la toxina Bt y la mayor atención asignada a los programas de monitoreo de la resistencia.

Los entomopatógenos son los microorganismos que ocasionan enfermedad a un determinado insecto plaga, conduciéndolo a su posterior muerte después de un corto período de incubación. Hoy en día se conocen pocas especies de estos microorganismos, aunque muchos de ellos atacan a una gran variedad de insectos

plaga que afectan a los cultivos, entre cuales se encuentran hongos, bacterias, nematodos, virus y algunos protozoos (INTAGRI, 2019).

De acuerdo a Inglis *et al.* (2010) citado por Albuquerque y Albuquerque (2009) los hongos son microorganismos heterotróficos, eucariontes, unicelulares o hifales (filamentosos), que presentan reproducción por esporas sexuales, asexuales o ambas.

Los hongos entomopatógenos (Hep) son patógenos obligados o facultativos que se desarrollan en insectos huéspedes de estos mismos lo que les provoca una enfermedad y su posterior muerte. Existen alrededor de 700 especies de hongos que son patógenas para insectos, algunas de los cuales se utilizan como productos de control biológico; dentro de los hongos más comúnmente asociados a enfermedades de insectos se encuentran los géneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium* y *Paecilomyces* (France *et al.*, 2016).

1.1. Justificación

Algunos estudios han revelado la importancia de continuar con la búsqueda de agentes de control biológico que puedan ser utilizados en el control de insectos plaga. El control biológico mediante el uso de organismos entomopatógenos representa una alternativa para el manejo integrado de insectos plaga en la agricultura. La supresión de plagas de Lepidoptera en muchos de los cultivos agrícolas es relevante, ya que son las plagas que mayor impacto tienen en la agricultura y además son el objetivo de la tecnología Bt, en varios cultivos. La identificación de agentes entomopatógenos que interactúan con las plagas blanco a la tecnología Bt, puede favorecer como una alternativa, principalmente cuando hay efectos de resistencia o para realizar estudios de los efectos de las toxinas Cry del Bt en los organismos no blanco.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Aislar hongos de larvas de Lepidoptera con signos y síntomas de enfermedad de algodón genéticamente modificado (Bt) y cultivos aledaños que interaccionan con la tecnología.

1.2.2. Objetivos específicos

- Colectar larvas del cultivo de algodón Bt y cultivos aledaños.
- Aislar, purificar e identificar los hongos que colonicen las larvas de Lepidoptera.

1.3. Hipótesis

De las larvas colectadas en el cultivo de algodón Bt se encontrarán hongos entomopatógenos colonizando.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

La bacteria *B. thuringiensis* es un bacillo Gram positivo, de flagelación peritrica que mide de 3 a 5 micrómetros de largo y de 1 a 1.2 micrómetros de ancho, esta bacteria es un microorganismo anaerobio-facultativo. Su característica principal es que, durante el proceso de esporulación, esta bacteria produce una inclusión paraesporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica, las cuales presentan toxicidad para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos del Orden Lepidoptera, Coleoptera y Diptera. Estas proteínas son denominadas Cry y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial Castañet y Moreno (2016).

2.1.1. Mecanismo de acción de las toxinas Cry.

Su mecanismo de acción ocurre cuando dichos cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos por el insecto y luego solubilizados en condiciones alcalinas que presenta el intestino medio de algunos insectos, después de ello se liberan las toxinas cristales en forma de protoxinas para posteriormente por acción de las proteasas, estas protoxinas pasan a convertirse en péptidos activos, los cuales son las toxinas que llevarán a la muerte de su huésped. La toxina activa es reconocida por un receptor específico y se inserta en la membrana del borde del cepillo del tracto digestivo del insecto, es ahí donde ocurre una oligomerización que resulta en la formación de canales catiónicos de 0.5 a 1 nanómetro de diámetro. Estos poros proporcionan un flujo inespecífico de iones, principalmente iones K⁺, que disipa los gradientes iónicos y disminuye el pH del medio lo que provoca una lisis celular osmótica que deja al huésped incapacitado para poder alimentarse. Por otra parte, la destrucción tisular permite la mezcla del contenido del tubo digestivo con la hemolinfa que, junto con el bajo pH, favorece la germinación de esporas

bacterianas, conduciendo a una septicemia y posteriormente la muerte del huésped en pocos días después de la ingestión de los cristales (Castañet y Moreno, 2016).

2.1.2. Cultivos genéticamente mejorados con Bt.

Los cultivos Bt fueron comercializados por primera vez en 1996 y estos fueron modificados genéticamente para poder producir en sus tejidos proteínas Cry. De tal manera que cuando las larvas se alimentan de alguna parte de la planta, mueran debido al efecto insecticida que presentan estas proteínas sobre las larvas de algunos insectos. Cabe destacar que las proteínas Cry son muy específicas para determinados tipos de insectos, lo que quiere decir que son inocuas para mamíferos, pájaros e insectos “no-blanco” (insectos para los cuales no está dirigida la tecnología Bt) como los insectos benéficos como depredadores, parasitoides, polinizadores y otros fitófagos. En el ser humano no llega a causar daño ya que en su intestino no están presentes los receptores para esta proteína Cry, además de que esta sólo actúa en medios alcalinos, como el del intestino del insecto, y no en ácidos, como el del hombre (ChileBio, 2018).

Los beneficios de los cultivos Bt se basan en la posibilidad de expresar el potencial de rendimiento en presencia de la plaga y una disminución en el número de aplicaciones de insecticidas, lo que conlleva a un beneficio económico y ambiental. Se ha demostrado además que el maíz Bt contiene niveles mucho menores de micotoxinas, en comparación con el maíz no Bt, y esto es debido a que al no haber daño por insectos en las plantas, no hay forma de que los hongos productores de estas toxinas, muy peligrosas para la salud humana y animal, la infecten (ChileBio, 2018).

Esta tecnología es vista como una herramienta adicional para el control de plagas de cultivos y podría ofrecer ciertas ventajas sobre los insecticidas químicos convencionales, entre ellas la selección más efectiva de insectos protegidos dentro de las plantas, una mayor resistencia a las condiciones climáticas, una

biodegradabilidad rápida, una menor exposición del operador a toxinas y ahorro financiero. El uso de plantas genéticamente modificadas con Bt puede llevar a una reducción en el uso de insecticidas de amplio espectro, lo que extiende la vida de uso útil de estos compuestos y reduciendo el daño ecológico que estos causan (Schuler *et al.*, 1998).

2.1.3. Resistencia de lepidópteros a cultivos Bt.

La resistencia es un cambio que es heredable en la susceptibilidad de una población de insectos, lo que provoca el fracaso de un producto plaguicida que ha sido utilizado repetitivamente y que dicho producto ya no sea eficiente contra la plaga a controlar. Como resultado de las aplicaciones continuas del mismo insecticida se ejerce una fuerte presión de selección de tal manera que prevalecen los insectos naturalmente resistentes, los cuales se aparean y dejan descendencia también resistente y volviéndose predominantes en la población. Así el tratamiento del plaguicida pierde efectividad y los productores se ven obligados a recurrir a otro plaguicida de diferente modo de acción, si es que está disponible. Las condiciones genéticas de las plagas junto con la aplicación intensiva y repetida de insecticidas son las principales causas de la rápida evolución de la resistencia en la mayoría de las plagas en general (IRAC, 2015).

La siembra a gran escala de cultivos genéticamente modificados con Bt dio comienzo en 1996 y creció rápidamente a más de 10 millones de hectáreas por año. El área acumulada de plantas Bt cultivadas en todo el mundo de 1996 a 2002 superó los 62 millones de hectáreas rápidamente. Más del 99% de esta área llegó a ser sembrada con maíz Bt o con algodón Bt que presentan en sus tejidos las toxinas Bt Cry1Ab o Cry1Ac con el objetivo de matar principalmente a larvas de plagas de lepidópteros. La exposición generalizada y prolongada a las toxinas Bt llega a representar una de las selecciones más grandes de resistencia en insectos que el mundo jamás haya visto (Tabashnik *et al.*, 2003).

Durante el lapso de más de 20 años de la comercialización de los cultivos Bt, se cuenta ya con reportes sobre la resistencia de ciertos insectos plaga a las toxinas Cry, principalmente de lepidópteros y coleópteros. De lo anterior mencionado, cabe destacar que el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera Noctuidae) es una de las especies más citadas, ya que se presenta en muchos casos de resistencia desarrollada en el campo a los cultivos Bt en diferentes lugares como Puerto Rico, Florida, Carolina del Norte y Brasil (Jurat, 2014).

Por otra parte, la palomilla dorso de diamante o polilla espalda de diamante (*Plutella xylostella* L.) es reconocida como uno de los insectos que ha desarrollado altos niveles de resistencia en el campo como resultado del uso repetido de Bt formulado. Sin embargo, la palomilla india (*Plodia interpunctella* Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) probablemente evolucionó a niveles bajos de resistencia en el grano almacenado tratado con Bt (Siegfried, 2001).

Tabashnik (2015), reportó más del 50% de una o más poblaciones de individuos en campo ya presentan resistencia, lo que conlleva a una eficacia reducida del cultivo Bt que tiene consecuencias prácticas para el control de plagas. Entre los más importantes e impactantes son seis de ocho casos que implican insectos del orden Lepidoptera resistentes a las toxinas Cry1: cuatro contra el maíz, donde se menciona la resistencia de *S. frugiperda* al Cry1F en Puerto Rico y Brasil, y la resistencia de *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) a Cry1Ab en Estados Unidos y Sudáfrica. Dos más contra el algodón Bt, donde se hace referencia a la resistencia a Cry1Ac por parte de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) en los Estados Unidos y *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) en la India.

Existen aclaraciones de que *H. zea* también puede llegar a estar desarrollando resistencia a la toxina Cry1Ab en el maíz de campo. Además de que se puede producir resistencia cruzada entre toxinas Cry estrechamente relacionadas, específicamente aquellas seleccionadas para resistencia a plagas en cultivos Bt de

un solo gen, lo que probablemente puede conducir a un desarrollo más rápido de resistencia a plagas en cultivos que expresan múltiples toxinas piramidadas. Otros informes han demostrado resistencia cruzada entre las proteínas de Cry1A en *H. zea* (Tabashnik, 2015).

Dively *et al.* (2017) mencionaron que *S. frugiperda* es resistente a la toxina Cry1F seleccionada en maíz Bt también fue altamente resistente al algodón Bt que expresaba las toxinas Cry1Ac y Cry1F. Por otra parte, se informó que con las cepas Cry1A.105 y Cry2Ab2, en *S. frugiperda* mostró resistencia cruzada. Recientemente se demostró que *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) y *S. frugiperda* compartieron los sitios de unión del intestino medio para Cry1A.105, Cry1Ab y Cry1Ac, lo que implica resistencia cruzada entre estas proteínas.

En el cultivo de algodón en México también se han realizado informes sobre la aparición de resistencia por parte de algunos insectos del lepidóptera como *P. gossypiella* (gusano rosado) y *H. zea* (gusano bellotero). Estas dos son de las principales plagas del algodón, las cuales han llegado a afectar muy gravemente su producción y causar cuantiosas pérdidas año con año en las zonas algodonerías del país como Mexicali, Baja California, la Comarca Lagunera, en la confluencia de Coahuila y Durango; Sonoyta en Sonora, así como en Delicias, Chihuahua y algunas zonas de Tamaulipas (CONACYT, 2018).

2.2. Microorganismos Entomopatógenos

Los microorganismos entomopatógenos son agentes microbiales responsables de causar una enfermedad a un insecto para posteriormente provocarle su muerte en un corto periodo de tiempo. Son pocas las especies que se conocen hasta el momento, aunque estas pocas especies llegan a atacar a una gran cantidad de insectos que dentro del ámbito de la agricultura representan un peligro para los cultivos. Estos patógenos de insectos tienen el inconveniente de que no buscan activamente al hospedador o presa como lo hacen los insectos entomófagos, por

ello no llevan la densidad de población del hospedador a niveles bajos. En la actualidad se ha incrementado potencialmente la aplicación de estos microorganismos en el campo agrícola como insecticidas biológicos, debido a que resultan ser una alternativa bastante rentable en los programas de manejo integrado de plagas (INTAGRI, 2019; Rossi, s.f.).

2.2.1. Bacterias entomopatógenas

Estas son bacterias por lo general Gram-positivas, flageladas, ubicuas, esporulantes, tienen una morfología alargada simulando un bastón, estas producen toxinas que son diferentes según la especie, pueden formar cristales (paraesporas) de proteínas tóxicas cuando esporulan como *B. thuringiensis* o *Paenibacillus popilliae* (Dutky) (Bacillales: Paenibacillaceae); estas poseen propiedades patógenas para insectos, las proteínas que proporcionan el efecto insecticida se denominan *delta*-endotoxinas que son de dos tipos: Cry y Cyt. La característica única de estas bacterias es su habilidad para producir endosporas bajo condiciones ambientales de estrés (físicas o químicas), gracias a esta capacidad son capaces de mantenerse inactivas por largos periodos de tiempo. Estos microorganismos entomopatógenos se encuentran fácilmente en el suelo, agua, polvo, etc., pueden ser aerobias estrictas o anaerobias facultativas; incluyen especies de vida libre como patógenas, también por su aptitud para ser tratadas industrialmente (son la base de varios insecticidas biológicos comerciales) y su aplicación en el campo (Portugal, 2011a).

La mayoría de las bacterias entomopatógenas invaden a sus hospederos al ser ingeridas, y gracias a la alcalinidad presente en el intestino medio de algunos insectos, las esporas se degradan y dejan libres a las proteínas, que para estos insectos son tóxicas, estas proteínas (toxinas) aparentemente se insertan en las membranas del intestino medio, aumentando la conductividad del potasio de las membranas apicales de células columnares, lo que lleva a la ruptura de los gradientes eléctricos de potasio y aumenta el pH de la hemolinfa, lo que causa la

destrucción parcial del intestino medio o mesenterón, por lo que se produce una fuerte septicemia que ocasiona posteriormente que el cuerpo y el intestino medio del insecto se paralicen y en algunos casos llega a dañar la lignina. Después de 24 horas el cadáver del insecto se comienza a tornar de un color oscuro, por la oxidación de la hemolinfa y crecen gran cantidad de bacterias saprofitas provenientes de su tracto digestivo (flora intestinal y del alimento) como del medio que lo rodea, el cuerpo se descompone en forma floculenta con excepción del integumento (exoesqueleto), posteriormente se seca y endurece, la mortalidad resulta del desequilibrio del contenido básico hipotónico del intestino medio y la hemolinfa, en algunos casos la muerte se da por la septicemia o disentería o ambas, después de la germinación de las esporas (Portugal, 2011a).

2.2.2. Protozoarios entomopatógenos.

Estos son microorganismos que de forma directa o en asociación con algún virus matan cantidades significativas de insectos. Existen aproximadamente 1,200 especies de protozoarios que llegan a causar enfermedades en los insectos, dentro de estas se pueden mencionar algunas especies importantes como: *Lambornella clarki* (Hymenostomatida: Tetrahymenidae), *Mattesia trogodermiae* (Neogregarinorida: Lipotrophidae), *Malamoeba locustae* (King y Taylor) (Amoebida: Amoebidae), *Nosema pyrausta* (Paillot) (Microsporidia: Nosematidae), *Nosema locustae* (Apansporoblastina: Microsporidia) y *Vairimorpha necatrix* (Kramer) (Pansporoblastina: Burenellidae). Sin embargo, al requerir mucho tiempo para lograr matar al hospedero, estos microorganismos no son considerados con prioridad como agentes patógenos en el control biológico de plagas. Los protozoarios que muestran baja virulencia se comportan como parásitos y generalmente viven en el intestino del insecto y causan tan sólo diarrea, mientras que los que tienen una alta virulencia atacan frecuentemente el cuerpo graso del insecto. El modo de acción de estos microorganismos inicia al ser ingeridos por el hospedero, donde llega hasta el intestino medio y ahí causan una infección viral que interrumpe el desarrollo normal de la larva y prolonga la etapa de esta. Al retener

por más tiempo el desarrollo normal de la larva permite que éstas queden por más tiempo expuestas a depredadores o la radiación solar para finalmente causarles la muerte. Si las larvas afectadas llegan al estadio adulto, por acción de los protozoarios se logra reducir la fecundidad de estos mismos (INTAGRI, 2019).

2.2.3. Virus entomopatógenos

Los virus son muy variables en lo que respecta tanto a su forma y tamaño, pero en general están constituidos principalmente por una capa de proteína llamada capsida, que rodea y proporciona protección al ácido nucleico, el cual representa la porción biológica del virus. Este ácido nucleico puede estar constituido de ADN o ARN de hebra simple o doble. En algunos virus, la nucleocápsida (ácido nucleico + cápsida proteica) puede estar envuelta por una bicapa lipídica, que forma un virión o partícula viral constituyendo la unidad infectiva del virus, los viriones pueden estar o no, incluidos en una matriz proteica denominada cuerpo de inclusión. Los virus tienen la característica de que forzosamente necesitan de un hospedante para multiplicarse junto a las células del mismo. Los virus entomopatógenos generalmente se han utilizado para el control de plagas muy dañinas, dentro de las cuales principalmente se encuentran las larvas de lepidópteros, estos suelen ser muy virulentos y no muestran amenazas a las plantas ni a los humanos. Se conocen alrededor de 450 tipos de virus capaces de causar enfermedades a insectos y ácaros (Gómez, 2008; Portugal, 2011c).

Existen dos tipos de virus importantes en el control biológico de insectos: los Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN) y los Virus de la Poliedrosis Citoplasmática (VPC); lo que los diferencia entre si es que el primero se multiplica dentro del núcleo de la célula y el segundo se multiplica fuera del núcleo. Aunque los más utilizados en la agricultura son los virus de la poliedrosis nuclear (Portugal, 2011c).

Para que se dé inicio con el modo de acción o ciclo infectivo de los virus entomopatógenos, en el caso los VPN, estos deben ser ingeridos por el huésped, y

gracias al intestino medio de algunos huéspedes la cápsula proteica que los protege se disuelve y estos inmediatamente penetran a las células del intestino medio y en su núcleo se reproducen excesivamente de tal modo que llegan a reventar la célula, lo mismo ocurre posteriormente en los demás tejidos de los órganos del huésped, lo que ocasiona también trastornos fisiológicos. El insecto deja de comer, no puede ovipositar y se reducen sus movimientos, lo que provoca la muerte dentro de tres a ocho días. Las larvas afectadas por VPN suelen volverse blanquecinas y granulares u oscuras, pueden llegar a colgar del ápice de las ramas de las plantas o las hojas y una característica principal es que el interior del individuo queda licuado y el exoesqueleto es quebradizo y fácilmente se exponen los poliedros al medio ambiente y así llegar a afectar a otros insectos que entren en contacto con estos poliedros (Gómez, 2008; Caballero y Williams, 2008; Portugal, 2011c).

2.2.4. Nematodos entomopatógenos

Los nematodos son animales conocidos popularmente como gusanos redondos por la forma de su cuerpo, pero su característica principal que les diferencia de otros filos de gusanos es que son pseudocelomados, es decir, su mesodermo sólo invade parcialmente el blastocele durante el desarrollo embrionario por lo que este queda reducido a espacios intersticiales. La mayoría de nematodos son bacteriófagos, que se alimentan de microorganismos y materia orgánica del suelo. Otros nematodos son parásitos de plantas y animales, y en muchos casos causan graves daños en los cultivos y el ganado, y existen otro tipo de nematodos que causan la enfermedad y muerte en los insectos y son denominados nematodos entomopatógenos (Recio, 2016; U.A., 2019).

Los nematodos entomopatógenos que han sido reportados como los mejores en control biológico pertenecen a los géneros *Heterorhabditis* (Poinar) (Strongylida: Heterorhabditidae) y *Steinernema* (Travassos) (Rhabditida: Steinernematidae), estos son patógenos obligados que presentan una alta virulencia y una rápida acción al matar a su huésped. Presentan solo un estadio donde se encuentran fuera

de su huésped, el cual es el J3 o juvenil infectivo, este estadio ingresa a su huésped a través de aperturas naturales (boca, espiráculos o ano) y penetra hasta llegar al hemocele del huésped. Estos nematodos están principalmente asociados con un grupo de bacterias de los géneros *Xenorhabdus* (Thomas y Poinar) (Enterobacterales: Morganellaceae) y *Photorhabdus* (Boemare) (Enterobacterales: Morganellaceae), las cuales entran al huésped junto con el nematodo y producen sustancias que con rapidez matan al huésped y protegen el cadáver de otro tipo de microorganismos. Los nematodos aprovechan dicho cadáver y algunas células bacterianas para alimentarse y completar su ciclo biológico hasta unas 3 veces (todo depende del tamaño del huésped). Cuando el alimento es agotado una nueva generación de J3 es producida y emerge desde el cadáver del huésped en el suelo para buscar uno nuevo (Sáenz, 2005).

2.2.5. Hongos entomopatógenos

Los hongos son organismos eucariotas y heterótrofos (que carecen de clorofila). Por lo general las células de algunos poseen una pared gruesa de un compuesto (polisacárido) llamado quitina, el cual les provee rigidez y resistencia. La mayoría de los hongos son pluricelulares (a excepción de algunos que son unicelulares como las levaduras) y sus cuerpos están constituidos por filamentos tubulares microscópicos, denominados hifas, que se ramifican y entrecruzan, para en conjunto conformar lo que se le conoce como micelio. Otra característica importante de los hongos es que estos poseen reproducción tanto sexual como asexual (Menéndez, 2004).

Los hongos entomopatógenos presentan una gran importancia dentro de los agroecosistemas, esto es debido a su capacidad natural para poder regular las poblaciones de insectos, ya que estos sobre salen de los demás microorganismos entomopatógenos por ser los principales causantes de las enfermedades y muerte de los insectos. Se conocen alrededor de 750 especies de estos hongos, donde la mayor parte de ellas incluidas en los grupos Hypocreales (Ascomycota) y

Entomophthorales (Zygomycota). El ataque de los hongos entomopatógenos se asocia a una gran cantidad de insectos, los cuales son infectados preferentemente en los estadios inmaduros (ninfa o larva). La especificidad con la que atacan a los insectos plaga es bastante variable, ya que algunos presentan un amplio rango de hospederos como los Hypocreales, mientras que otros como los Entomophthorales están restringidos a una especie de insecto. Entre los principales géneros de hongos entomopatógenos más reconocidos y que más se utilizan en la agricultura se encuentran: *Beauveria* (Vuill) (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Metarhizium* (Sorokin) (Hypocreales: Clavicipitaceae), *Paecilomyces* (Bainier) (Eurotiales: Thermoascaceae) y *Verticillium* (Glomerellales: Plectosphaerellaceae) (INTAGRI, 2019).

El ciclo vital de estos hongos se divide en una fase parasítica, que va desde la infección hasta la muerte del hospedero y una saprofita, que transcurre después de la muerte del insecto. Este aspecto de su biología, permite a los hongos entomopatógenos actuar como patógenos facultativos, es decir, son capaces de sobrevivir a expensas de la materia orgánica del suelo u otro sustrato, mientras no haya insectos disponibles para infectar. Los hongos entomopatógenos atacan a insectos de diferentes órdenes como: Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera y Orthoptera, y también a otros artrópodos, como arañas y ácaros (Urra, 2015).

Los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes entomopatógenos, no necesariamente tienen que ser ingeridos por el insecto para controlarlo, la infección puede ocurrir por contacto y adhesión de las esporas al tegumento o en su defecto la cutícula del insecto o las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos. El mecanismo de acción se basa en tres pasos: 1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, 2) penetración en el hemocele y 3) desarrollo del hongo, en donde generalmente resulta con la muerte del insecto o huésped (Fig. 1) (Pucheta *et al.*, 2006; Téllez *et al.*, 2009).

El mecanismo de acción da inicio cuando la espora del hongo entra en contacto con el integumento del insecto huésped y ahí es donde comienza el proceso de adhesión donde el hongo se adhiere gracias a unas moléculas que este mismo posee y segrega, las cuales se denominan adhesinas, este proceso de adhesión implica 3 pasos donde el primero es la adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, posteriormente la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula y por último, se inicia el proceso de germinación de la espora, el cual comienza cuando las condiciones ambientales son favorables, en donde la temperatura tiene que oscilar entre los 25 a 29 °C, y la humedad relativa se encuentre entre el 85 a 95 %. Cuando se cumplen dichas condiciones antes mencionadas, es ahí entonces cuando la espora se hincha y comienza a desarrollar un tubo germinativo mediante un proceso de polarización típico del crecimiento apical de los hongos, el cual estimula la síntesis de la pared celular. El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, para de tal manera habilitar a la hifa en la penetración de la cutícula. El proceso de germinación puede durar de 12 a 20 horas (Pucheta *et al.*, 2006; Téllez *et al.*, 2009; Carrillo y Blanco, 2009; Portugal, 2011b; Gómez *et al.*, 2014).

Posteriormente se inicia el segundo paso, el cual es el proceso de penetración y este es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos, uno físico y uno químico, donde el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada apresorio, el cual fue formado a partir del tubo germinativo una vez que encontró un sitio receptor. El apresorio permite el anclaje de la espora y ejerce presión hacia el interior del insecto, lo que provoca que se deforme primeramente la capa cuticular para posteriormente romper las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, es decir, cuando el hongo comienza a excretar una gran cantidad de enzimas, principalmente proteasas, lipasas, quitinasas, quitobiasas, lipoxigenasas y otras proteínas hidrolíticas, las cuales degradan poco a poco el tejido en la zona

de penetración de tal manera que facilite la entrada del hongo. A su vez este proceso le proporciona alimento al mismo al hongo. El tiempo de penetración tiene una duración aproximada de 8 a 12 horas. (Pucheta *et al.*, 2006; Téllez *et al.*, 2009; Carrillo y Blanco, 2009; Portugal, 2011b; Gómez *et al.*, 2014).

Otro mecanismo de acción es cuando los hongos ingresan directamente hacia el interior de su huésped. Consiste en que la espora puede penetrar hacia el hemocele del insecto a través de la cavidad bucal, espiráculos u otras aberturas externas del insecto, ya que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio y así la espora puede germinar rápidamente en este ambiente, aunque cabe destacar que los fluidos digestivos pudieran destruirla o degradar la hifa germinativa. Un dato importante es que, en algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por la invasión interna del hongo conocida como micosis (Téllez *et al.*, 2009).

Una vez que el hongo se encuentra dentro del insecto huésped, se da inicio al tercer y último paso, en donde este prolifera y forma cuerpos hifales secundarios, los cuales se ramifican en la procutícula conformada principalmente de fibrillas lameladas de quitina embebidas en una matriz proteínica que actúa como cubierta física protectora ante las secreciones extracelulares del patógeno. Posteriormente, dichos cuerpos hifales se topan con la capa epidérmica y con su respectiva membrana basal y se diseminan a través del hemocele. Una vez dentro del hemocele los hongos deben enfrentarse con los mecanismos de defensa del sistema inmune del insecto, para lo cual los hongos han desarrollado estrategias defensivas e inmunosupresoras, tales estrategias como la producción de toxinas o cambios estructurales en su pared celular. Después de que el hongo haya evadido dichas defensas del sistema inmune del insecto, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido de este mismo, en forma de levaduras o desarrollo por gemación, y produce así formas miceliales libres y unicelulares llamados blastosporas que invaden diversas estructuras vitales del huésped como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y

membrana nuclear, a su vez los hongos que producen toxinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos y por la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido. Los hongos que aparentemente no poseen toxinas, matan al insecto al consumir todos los nutrientes o por destrucción física de sus sistemas. La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (Pucheta *et al.*, 2006; Téllez *et al.*, 2009; Carrillo y Blanco, 2009; Portugal, 2011b; Gómez *et al.*, 2014).

Al agotarse los nutrientes del huésped, y si las condiciones ambientales le son favorables, el hongo inicia un crecimiento micelial donde invade todos los órganos del hospedero y finalmente las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie para iniciar la formación de cuerpos reproductivos con esporas, estas son las unidades infectivas y se diseminan por medio del viento, lluvia, animales, hombre, buscando nuevos hospedantes para iniciar el proceso de infección. Por otra parte, si las condiciones ambientales no son favorables, el hongo se queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá esporas cuando las condiciones le sean favorables. La dispersión de las esporas puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características de la espora y el esporangio, cada conidio puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Pucheta *et al.*, 2006; Portugal, 2011b).

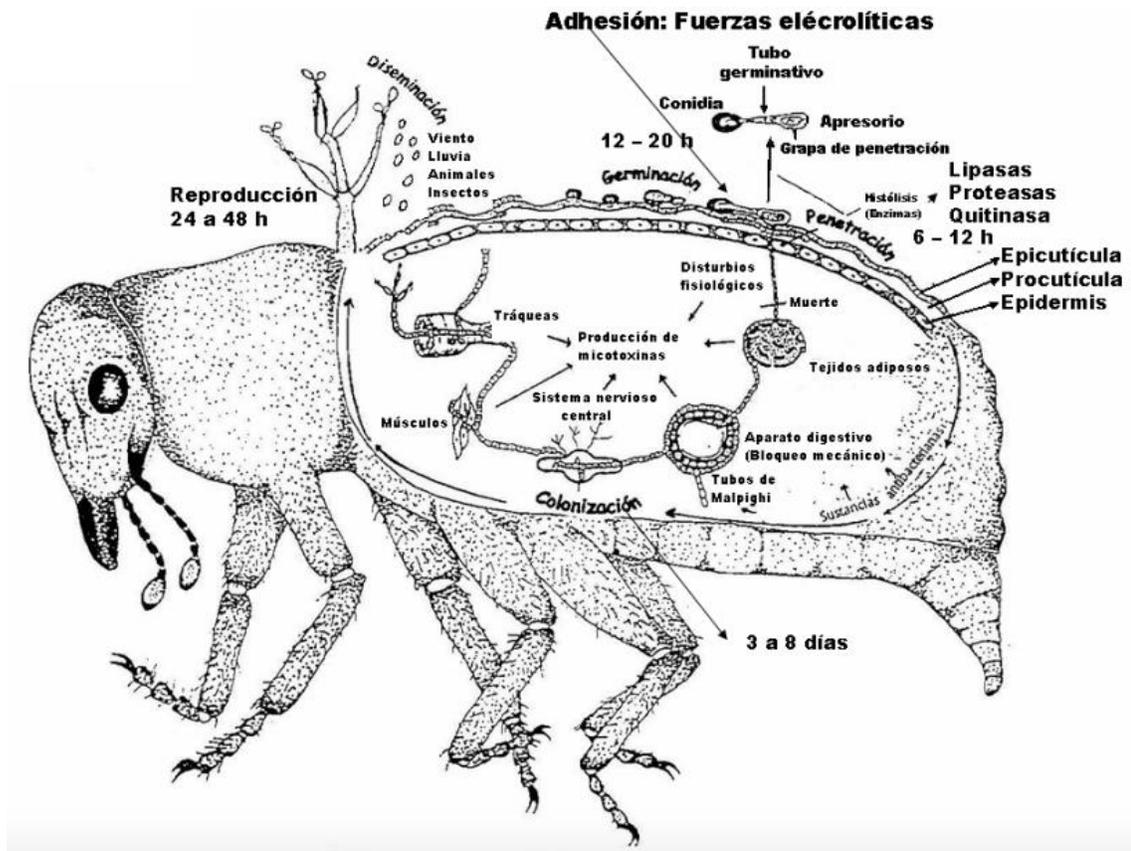


Figura 1. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos (Fuente: Gómez *et al.*, 2014).

Los insectos que han sido afectados por algún tipo de hongo entomopatógeno, presentan una decoloración del integumento, el cual poco a poco va perdiendo su coloración característica, sus patas se vuelven rígidas y el insecto se fija al sustrato mediante la proboscis; se pueden observar filamentos finos solos o agrupados, de coloración oscura que atraviesan la pared del insecto por la parte ventral, estos filamentos son los rizoides, los cuales se tornan cada vez más y más claros hasta volverse de un color blanco cremoso, donde se puede observar como si la cutícula del insecto estuviese llena de gránulos o parches finos visibles al estereoscopio, luego se van oscureciendo, y pasan por colores como marrón claro, marrón pajizo, y finalmente se oscurecen más hasta volverse de un color marrón oscuro, algunos insectos se tornan de un color ocre o marrón rojizo y otros se vuelven negros. Los gránulos o parches son los estromas formados por el desarrollo micelial, aunque en la mayoría de los casos el color que adquiere el insecto depende del color de los

conidios del hongo o del micelio. En la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales que impiden la descomposición del insecto manteniéndolo como una momia. El tiempo que dura la colonización es de 3 a 8 días, dependiendo de la cepa del hongo (Portugal, 2011b; Gómez *et al.*, 2014).

Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y los funguicidas. La susceptibilidad y la relación con los hospederos se entrelaza con los nutrientes presentes en los insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos. Como se mencionó anteriormente, las esporas de los entomopatógenos tienen requerimientos específicos de agua y temperatura, así como de otros factores ambientales que en conjunto funcionan como inductores para la activación de receptores presentes en el patógeno y que les permiten llevar a cabo el proceso infectivo sobre el hospedero (Pucheta *et al.*, 2006).

2.3. *Beauveria bassiana* (Balsamo)

La clasificación taxonómica de *B. bassiana* de acuerdo a Bischoff *et al.* (2006) citado por Hernández (2016) es la siguiente:

Reino: Fungi

Sub reino: Dikarya

Filum: Ascomycota

Sub filum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Sub clase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *Beauveria bassiana* Balsamo

Este es un hongo que se ha reportado como patógeno para algunos artrópodos que son clasificados como plagas para el hombre. Ha sido aislado de más de 200 especies diferentes de insectos. Es un hongo anamórfico que en su estado infeccioso forma hifas septadas y produce conidios hialinos esféricos o subesféricos de 2.0 a 3.0 x 2.0 a 2.5 micras con un cuello corto, el raquis presenta una ondulación o forma de zigzag. Los conidióforos se agrupan en forma compacta constituyendo los sinemas donde se originan los conidios (Fig. 2) (Vázquez, 2019a; Gómez *et al.*, 2014).

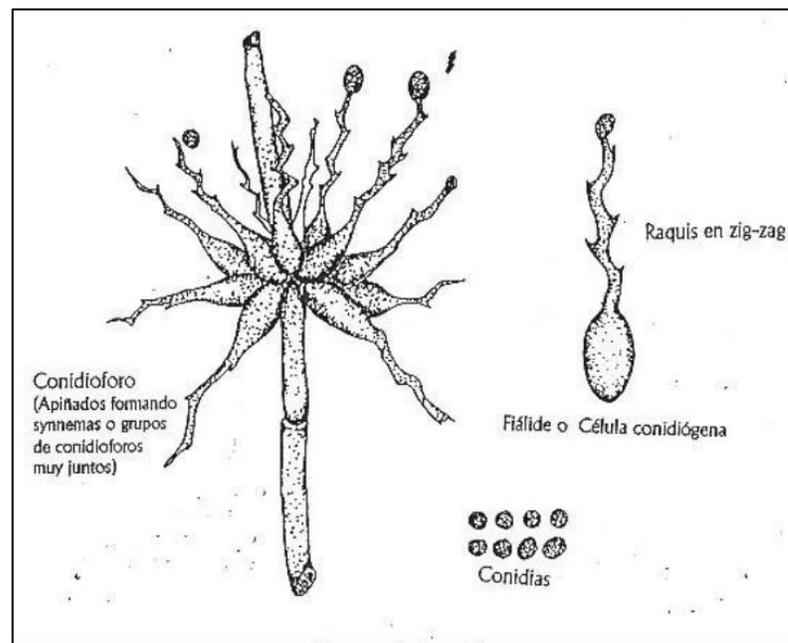


Figura 2. Estructuras del hongo *Beauveria bassiana*
(Fuente: Gómez *et al.*, 2014).

En el hospedero estas estructuras se observan como una especie de polvo blanco o algodonoso, el cual está conformado por micelio y esporas sobre el cuerpo del insecto hospedero (Fig. 4). Además, cultivos de laboratorio se presenta de igual manera como un polvo blanco en la superficie y de coloración amarillenta al reverso de las placas (Fig. 3) (Vázquez, 2019a; Gómez *et al.*, 2014).



Figura 3. Crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* en medio de cultivo (Fuente: Gómez *et al.*, 2014).



Figura 4. Crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* en un hospedero (Fuente: Gómez *et al.*, 2014).

2.4. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff)

La clasificación taxonómica de *M. anisopliae* de acuerdo a Sorokin (1883) citado por Suarez (2010) es la siguiente:

Reino: Fungi

Filum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

Especie: *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff

El hongo *M. anisopliae* es un patógeno de amplio espectro, localizado en el suelo y restos de insectos parasitados. Se cita como uno de los biocontroladores con mayor potencial entomopatógeno en el control de insectos plaga en diferentes cultivos agrícolas (Vázquez, 2019b; Sterling *et al.*, 2011).

Presenta hifas septadas con conidióforos que crecen a partir de éste, en forma irregular con dos a tres ramificaciones en cada septo. Estos conidióforos presentan

una longitud de 4 a 14 micras, y un diámetro de 1.5 a 2.5 micras. Las fiálides son delgadas en el ápice, de 6 a 15 micras de longitud y 2 a 5 micras de diámetro. En cuanto a los conidios, son estructuras unicelulares, de forma cilíndrica y truncada, de largas cadenas, de color hialino cuando son jóvenes y verde oscuro característico de la especie cuando ya están maduras, estos tienen una longitud de 4 a 10 micras y un diámetro que va de 2 a 4 micras (Fig. 5) (Vázquez, 2019b).

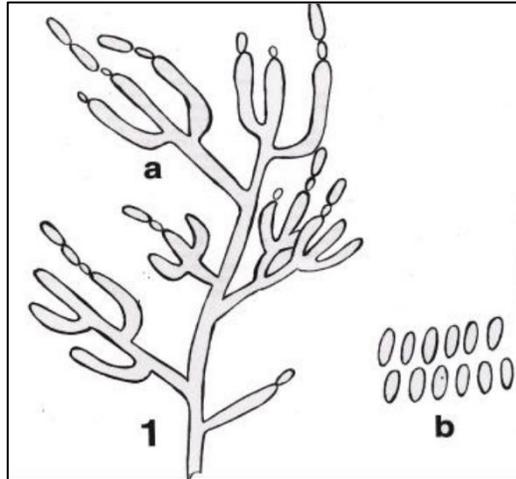


Figura 5. Estructuras del hongo *Metarhizium anisopliae*. a) Conidióforos. b) Conidios (Fuente: Gómez *et al.*, 2014).

Los huéspedes son cubiertos en su totalidad por un micelio de color verde, en referencia a la enfermedad denominada muscardina verde, la cual está conformada principalmente por estructuras reproductivas del hongo (Fig. 7). En cuanto al crecimiento de colonias en laboratorio, se presentan de un color verde que varía desde el oliváceo hasta amarillo-verde o verde oscuro (Fig. 6) (Vázquez, 2019b; Gómez *et al.*, 2014).



Figura 7. Crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* en medio de cultivo (Fuente: Anónimo, 2016).



Figura 6. Crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* en insecto hospedero (Fuente: Vázquez, 2019b).

2.5. *Lecanicillium lecanii* (Zimm)

La clasificación taxonómica de *L. lecanii* de acuerdo a Zare y Grams (2001) citado por Vargas (2017) es la siguiente:

Reino: Fungi

Filum: Ascomycota

Sub filum: Ascomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Lecanicillium*

Especie: *Lecanicillium lecanii* Zimm

Este hongo entomopatógeno es de amplia distribución y ha sido aislado de sustratos como el suelo, otros hongos, así como de insectos en todas sus etapas de desarrollo. Ocasiona epizootias de gran magnitud en ambientes cálidos y húmedos en un amplio rango de hospederos como en insectos de los órdenes Hemiptera (Auchenorrhyncha y Sternorrhyncha), Coleoptera, Diptera y Lepidoptera y ácaros de la familia Tetranychidae (Alayo y Wilson, 2014; Vargas, 2017).

Presenta un micelio septado con conidióforos simples o verticilados alargados, más anchos en la base y adelgazándose hacia los extremos en donde se encuentran los conidios agrupados en cabezuelas, rodeados de una sustancia mucilaginosa, estos son unicelulares, hialinos, forma cilíndricos a ovoides, de un tamaño 2.3 a 10 micras de largo y 1.2 a 6.0 de ancho (Figura 8) (Acosta, 2006; Gómez *et al.*, 2014).

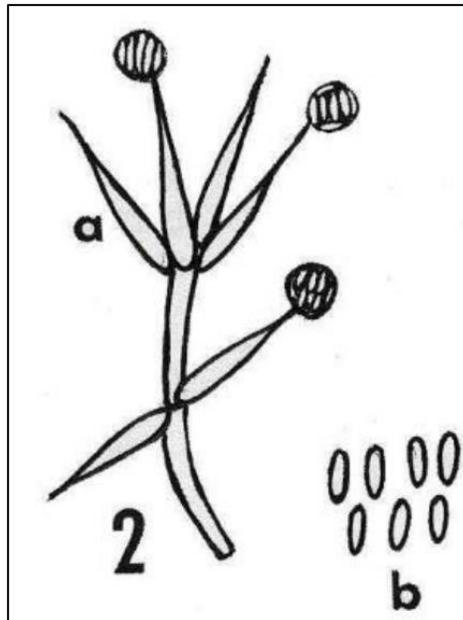


Figura 8. Estructuras del hongo *Lecanicillium lecanii*. a) Conidióforos. b) Conidios (Fuente: Gómez *et al.*, 2014).

Cuando este hongo termina de infectar a su hospedero, lo cubre con un micelio color blanco que lo rodea como un halo, lo cual es una característica que identifica a este hongo conocido comúnmente como “hongo blanco de la corona” (Fig. 10). En cuanto a su crecimiento en medio de cultivo se muestran colonias de color blanco o crema, de aspecto algodonoso y delicado, el micelio muy pegado al sustrato e incoloras al reverso, aunque también puede presentarse un color amarillo pálido o amarillo oscuro (Fig. 9) (Gómez *et al.*, 2014).



Figura 10. Crecimiento del hongo *Lecanicillium lecanii* en medio de cultivo (Fuente: Gómez *et al.*, 2014).



Figura 9. Crecimiento del hongo *Lecanicillium lecanii* en un insecto hospedero (Fuente: Micsa, 2018).

2.6. *Isaria fumosorosea* (Wize)

La clasificación taxonómica de *I. fumosorosea* de acuerdo a Wize (1904), citado por Gandarilla (2012) es la siguiente:

Super reino: Eukaryota

Reino: Fungi

Sub reino: Dikarya

Filum: Ascomycota

Sub filum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Sub clase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Isaria*

Especie: *Isaria fumosorosea* Wize

El hongo *I. fumosorosea* es un entomopatógeno fúngico realmente efectivo, al cual se le puede encontrar presente en el suelo, el aire, las plantas y en todos los

continentes del mundo, a excepción de la Antártida. Presenta un alto rango de hospederos en los que predomina más los del orden Lepidoptera, así como a insectos de los órdenes Acari, Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Neuroptera y Thysanoptera los cuáles son atacados por este hongo entomopatógeno (Gandarilla, 2012).

Este hongo presenta micelio septado o tabicado con conidióforos verticilados que se pueden producir solos o en grupos, de paredes lisas hialinas, y con 3 a 6 células conidiógenas o fiálides, las cuales son subglobosa con un cuello estrecho en forma de botella de donde nacen las conidias, ovoides a subglobosas de tamaño entre 3 a 4 micras de largo y 1 a 2 micras de diámetro, son lisas, hialinas o ligeramente rosadas, unicelulares, que se desarrollan en sucesión basipétala (Fig. 11) (Gandarilla, 2012; Gómez *et al.*, 2014).

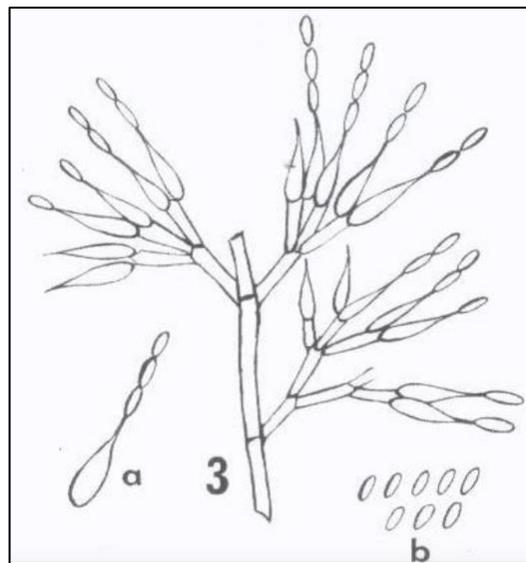


Figura 11. Estructuras del hongo *Isaria fumosorosea*. a) Conidióforos. b) Conidios. Fuente: Gómez *et al.*, 2014.

El crecimiento en medio de cultivo de las colonias tiene un aspecto de fieltro o pueden tener un aspecto polvoriento a granular. Producen conidioforos definidos que son polvorientos cuando el hongo es aislado por primera vez. Al principio las colonias son blancas, y pueden permanecer así o cambiar con el tiempo a

tonalidades rosadas y grisáceas (Fig. 12). El crecimiento en sus hospederos se muestra como una capa blanca algodonosa o afelpada y polvorienta, la cual está constituida principalmente por micelio y estructuras reproductivas del hongo (Fig. 13) (Garandilla, 2012).



Figura 13. Crecimiento del hongo *Isaria fumosorosea* en medio de cultivo (Fuente: Gómez *et al.*, 2014).



Figura 12. Crecimiento del hongo *Isaria fumosorosea* en un hospedero (Fuente: MICSA, 2018).

2.7. Asociación de lepidópteros como vectores de fitopatógenos

Existen insectos que pueden llegar a comportarse como vectores de algunos microorganismos fitopatógenos, dentro de ellos se encuentran los del orden Lepidoptera en donde investigaciones realizadas por Popova *et al.* (2010), encontraron que la palomilla de la papa (*Phthorimaea operculella* Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) es un reservorio y vector de agentes causales de infecciones, no sólo entre las plantas, sino probablemente entre Animales y los humanos también. En un trabajo de investigación realizado por Yamoah *et al.* (2011), evaluaron a diferentes tipos de insectos para observar su potencial como vectores del hongo *Fusarium tumidum* (sherbakoff) (Hypocreales: Nectriaceae), en donde se involucraron insectos del orden Lepidoptera, tales como la polilla de manzana marrón (*Epiphyas postvittana* Walker) (Lepidoptera: Tortricidae) y la polilla de la vaina (*Cydia ulicetana* Denis y Schifferm'ller) (Lepidoptera: Tortricidae), en dicho estudio los investigadores llegaron a la conclusión de que la polilla de manzana marrón fue la que transportaba y depositaba el mayor número de conidios

del *F. tumidum*, lo que quiere decir que actúa como un muy buen vector de este hongo. Por otra parte, un estudio realizado por Hou *et al.* (2015), demostraron que la polilla *Euzophera pyriella* (Yang) (Lepidoptera: Pyralidae) actúa como vector del hongo *Valsa ceratosperma* (Tode) (Diaporthales: Valsaceae) ya que las larvas prefieren alimentarse de la parte infectada por el hongo, por lo que la larva al estar en contacto en esta zona, parte del hongo (micelio o esporas) se queda adherida en alguna parte del cuerpo de la larva y así, esta misma estaría actuando como vector al trasladarse a otra parte de la planta, en donde se provoca una nueva infección. Bush *et al.* (2017), demostraron un caso similar, en donde el gusano naranja redondo (*Amyelois transitella* Walker) se alimenta preferentemente de las partes de la planta dañadas con *A. flavus*, por lo que *A. transitella* actúa como vector de este hongo al estar en contacto en zona dañada y trasladarse posteriormente a una parte sana de la planta.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colecta de larvas en el cultivo de algodón y maíz Bt

La recolección de las larvas se realizó en el norte del país en la región de La Laguna, específicamente en el estado de Coahuila de Zaragoza, México de los municipios de Matamoros y San Pedro de las Colonias. Una de las zonas con mayor importancia donde se cultiva algodón GM, con la tecnología Bt y en cultivos aledaños que interaccionan con éste.

El método de colecta que se realizó fue totalmente al azar, donde se efectuaron recorridos en los campos de cultivo; para el caso de algodón se buscaron bellotas afectadas por larvas de lepidópteros, o estas mismas expuestas sobre el follaje o bellota y en cultivos aledaños como el maíz se obtuvieron las larvas del cogollo o de jilotes.

Las larvas recolectadas vivas fueron puestas individualmente en botes pequeños de aproximadamente 5.0 mL de capacidad, en los cuales se colocó previamente dieta artificial para larvas de lepidópteros.

Entre las especies objetivo a coleccionar se buscó que fueran: *S. frugiperda*, *H. zea*, *Heliothis virescens* y *Spodoptera exigua*.

El material biológico coleccionado se trasladó a las instalaciones del Departamento de Parasitología de la UAAAN en Buenavista, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, coordenadas geográficas 101° 1' 56" de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich y a 25° 21' 13" de Latitud Norte con una altura sobre el nivel del mar de 1743 metros. Los insectos se seleccionaron, entre individuos vivos y los que se encontraban muertos o con poca actividad y éstos últimos también se separaron, según las características que presentaban o los daños que estos tenían.

3.2. Selección de larvas

Las larvas provenientes de campo se separaron en el laboratorio, por lo que el área en donde se trabajó fue aseada y desinfectada con alcohol y con la ayuda de un mechero y pinzas; se seleccionaron larvas vivas de las que se encontraban muertas, enfermas, parasitadas, con daño mecánico, en estado de diapausa y que no aceptaron la dieta como alimento. Es importante señalar que la dieta artificial en la que se colocaron las larvas, fue tratada con bactericida y fungicida, con la finalidad de asegurar que los individuos colectados infectados fueran desde campo y no por alguna contaminación en el laboratorio o por el alimento, después de la colecta.

La separación entre las larvas muertas se realizó con referencia a los síntomas característicos que presentaban. Para el caso de la infección por hongos se consideró que hubiera presencia de micelio en el integumento; las larvas que presentaban un color oscuro y estaban rígidas fueron catalogadas como infección por bacteria (aunque existía la duda de que estas hubiesen sido infectadas por un hongo y que este aún no desarrollara el crecimiento de micelio o hubiera esporulación), y las larvas que presentaron de igual manera un color oscuro pero en lugar de estar rígidas estas se presentaban con una textura aguada fueron catalogadas como infección por virus y que además cuando se llegaban a manipular su interior salía del integumento en forma desintegrada.

Cada larva se colocó en forma individual en un bote y se mantuvieron por dos días en incubación a temperatura ambiente para determinar la condición de éstas, posteriormente a esto se refrigeraron a 4.0 °C, para después ser utilizadas en el aislamiento del patógeno. Esta actividad fue constante durante el periodo de colectas en campo, por lo que cada vez que se realizaba la colecta, se procedía a la selección de las larvas y se almacenaban (Fig. 14).



Figura 14. Selección y almacenamiento de larvas.

3.3. Obtención de cepas fúngicas

Las larvas fueron retiradas de refrigeración y sólo las que se encontraban completas y rígidas, o con algún crecimiento micelial, fueron utilizadas para hacer los aislamientos, por lo que se procedió a desinfectar el material.

La desinfección del material biológico se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar y con la ayuda de pinzas se sumergió cada larva (con respecto a su catalogación) en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por cinco minutos, un lavado con agua destilada estéril, este procedimiento se repitió dos veces posteriormente se dejaron secar en una caja Petri con papel desecante estéril por 24 h, esto para asegurar que no hubiera contaminación por los residuos de agua que quedaron en las larvas (Fig. 15).



Figura 15. desinfección de larvas.

La desinfección se realizó con la finalidad de inactivar cualquier hongo o microorganismo que se encontrase en el tegumento del insecto, así como favorecer el crecimiento o la recuperación de los hongos que se encontraran dentro del cuerpo del insecto muerto.

Las larvas se colocaron en cámara húmeda y en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar. La cámara húmeda, consistió de una caja Petri con papel desecante estéril, se humedeció con agua destilada estéril y se colocaron tres larvas, distribuidas en el interior de la caja; las cajas se sellaron con Parafilm® y se dejaron reposar por un periodo de tres días (Fig. 16).

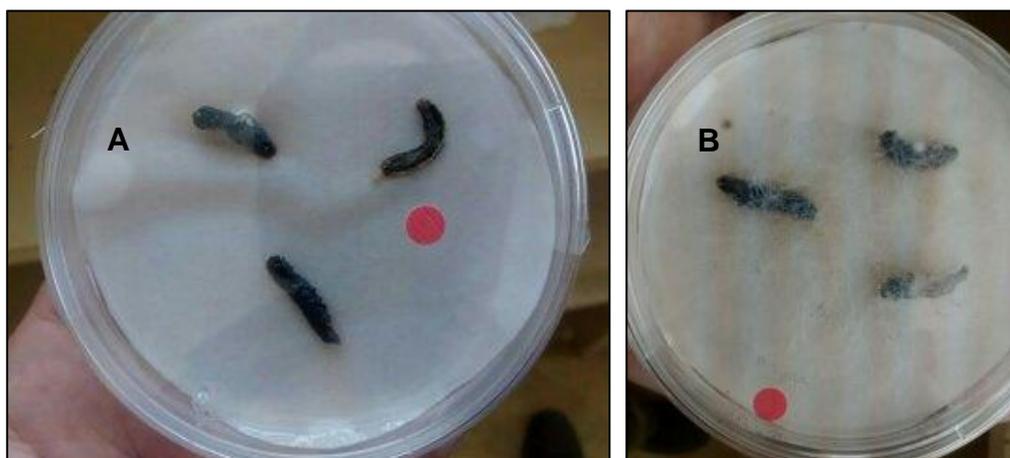


Figura 16. Larvas en cámara húmeda. A) Larvas recién colocadas. B) Larvas después de tres días de reposo.

En el caso del PDA se colocaron tres larvas por caja Petri (Fig. 17). Las larvas se incubaron a 25-26°C, bajo oscuridad; así mismo las cajas se acomodaron y etiquetaron de acuerdo al síntoma que presentó cada una de las larvas. Las que fueron catalogadas como infección por bacteria, también fueron colocadas en las dos formas de incubación, con el propósito de que, si alguna larva se diagnosticó erróneamente, ésta expresará el micelio en el integumento de esta misma, y pudieras ser aislado.

Todo el procedimiento se estableció de esta forma con el fin de estimular la formación de estructuras reproductivas de los hongos o el crecimiento bacteriano, debido a las condiciones apropiadas de humedad que otorga la cámara húmeda y el medio de cultivo.

La preparación del medio de cultivo se realizó de dos formas, uno consistió en PDA al cual se le agregó gentamicina ($1.0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) como bactericida y otro sin gentamicina.



Figura 17. Larvas en PDA.

3.4. Aislamiento de patógenos

En cuanto trascurrieron tres días después de haber dejado incubar las larvas en la cámara húmeda y cuando hubo presencia de crecimiento micelial en el cuerpo de las larvas que fueron catalogadas con síntomas de infección por hongo. Se procedió a trabajar en el laboratorio, en donde bajo una campana de flujo laminar y con la ayuda de pinzas se colocó una larva en medio de cultivo PDA con gentamicina. Las cajas Petri fueron selladas y fechadas, y se volvieron a colar en incubación, dentro de una caja plástica a temperatura ambiente, hasta que se desarrollara el hongo.

3.5. Purificación y re-aislamientos de hongos

Una vez transcurrido el tiempo anteriormente mencionado y cuando ya era visible el crecimiento de diferentes hongos en las larvas y expansión de éstos en el medio de cultivo, así como en algunos casos presencia de contaminaciones, por otros hongos y/o en su caso bacterias, se procedió a hacer purificación y re-aislamiento de las cepas morfológicamente diferentes. En las cajas donde no se encontraron contaminantes y el crecimiento micelial era homogéneo, no se realizó re-aislamiento, Las larvas que presentaron crecimiento con bacterias fueron desechadas.

Para el re-aislamiento el procedimiento también se realizó en la campana de flujo laminar, cerca de un mechero y con una aguja de disección se cortaron explantes del medio de cultivo con crecimiento micelial de 0.5 x 0.5 mm de superficie, aproximadamente, estos cortes, fueron con base en la diferenciación morfológica de los crecimientos. Se consideró para la toma de micelio el lado opuesto de donde se encontraba el crecimiento del otro agente, para evitar en lo más posible una contaminación posterior. Las nuevas cajas Petri fueron selladas y etiquetadas de acuerdo a la fecha del re-aislamiento y la fecha inicial, y si ésta procedía de cámara húmeda o PDA, con bactericida y sin bactericida. Se volvieron a someter a incubación para inducir la formación de estructuras reproductivas y de esta forma

facilitar la identificación. El proceso de re-aislamiento y purificación se llevó a cabo las veces necesarias para dejar la cepa limpia libre de contaminantes y homogénea morfológicamente, sin perder identidad.

3.6. Aislamiento de hongos en larvas sometidas a cría

Las larvas procedentes de campo se sometieron a un proceso de cría y mantenimiento, esto para fines de otro experimento, sin embargo, durante este proceso algunas larvas enfermaron y murieron a consecuencia de alguna infección por bacterias, virus, hongos, u otra causa de tipo abiótica como la composición de la dieta. Estas larvas también se separaron y se sometieron a aislamiento, purificación y re-aislamiento sólo para el caso de hongos, por tanto, las larvas muertas que presentaron crecimiento micelial en su cuerpo, fueron consideradas; para el caso de otros patógenos no se trabajó. Estas larvas no fueron esterilizadas y sólo con la ayuda de unas pinzas, se colocaron directamente en un medio de cultivo a base de PDA con gentamicina. Las cajas Petri fueron selladas y etiquetadas de acuerdo a la fecha y la generación filial de la que procedían, así como la especie, y fueron incubadas como correspondía. Se llevó a cabo la purificación y re-aislamientos necesarios para dejar limpia la cepa de contaminantes y se dejaron crecer de dos a tres semanas, con el propósito de inducir la formación de estructuras reproductivas para así iniciar el proceso de identificación.

3.7. Identificación morfológica de los aislamientos de hongos

Los hongos purificados y crecidos en las cajas Petri se agruparon por las características morfológicas del crecimiento del micelio y por su color, se seleccionaron tres cajas Petri de cada uno; por tanto, se trasladaron a una mesa de trabajo (la cual previamente se aseó y desinfectó con alcohol al 70%), en donde se encontraba el material necesario para realizar montas o preparaciones (microscopio, portaobjetos, cubreobjetos, lactofenol con azul de metileno , mechero de alcohol, y una jeringa de insulina).

El procedimiento que se llevó a cabo para realizar las montas fue el siguiente: Primero se añadió una gota de lactofenol con azul de metileno sobre un portaobjetos, después se esterilizó la punta de la aguja de insulina, para ello, se colocó la punta de la misma sobre el fuego del mechero durante diez segundos, posteriormente se retiró y se dejó enfriar cerca del mechero por quince segundos, consecuentemente se destapó una caja Petri cerca del mechero y con la aguja de insulina se efectuó un raspado superficial para así extraer estructuras fúngicas, las cuales fueron colocadas sobre la gota de lactofenol y se dispersaron con la aguja de insulina, posteriormente se colocó el cubreobjetos sobre la muestra y se le dio paso a esta misma sobre el fuego del mechero varias veces con el motivo de liberar las burbujas que se habían formado, por último se dejó enfriar por unos segundos y enseguida el portaobjetos fue colocado en el microscopio para observar las estructuras del hongo.

Se tomaron fotografías y se realizaron anotaciones sobre el crecimiento de la colonia en la caja Petri, tanto el color que presentó en el frente y al reverso, como el aspecto que presentaba. Así mismo, de igual manera se tomaron fotografías e hicieron anotaciones sobre las estructuras de los hongos bajo el microscopio, tales como el color de hifas y su forma, y de sus estructuras reproductivas (conidióforos y conidios). Esto con el fin de realizar la identificación mediante claves impresas, libros y revisión en la Web, sobre los hongos y las características observadas, al menos a nivel de género (Gil, 2019a; Gil, 2019b; Reyes, 2001; Manrique, 2014; Loustau, 1950; Jamali y Banihashemi, 2011; Samson *et al.*, 2009; Carnovale y Guelfand, 2012; Pinheiro, 2015).

En el caso de los hongos que no esporularon o no fue posible ver estructuras reproductivas o aptas para identificación fue necesario preparar otros medios de cultivo como Agar-Agar con gentamicina, PDA + Extracto de levadura con gentamicina, Agar + extracto de malta con gentamicina y Caldo de Papa-Dextrosa, medios específicos para hacer esporular algunos hongos que están relacionados

con patógenos de insectos y en su caso con finalidad de estresar al hongo y favorecer la esporulación, en este sentido, también se modificaron las condiciones ambientales de incubación, en algunos casos fue necesario someterlos a frío, a luz o por periodos cortos de luz y/o oscuridad.

3.8. Identificación molecular de las cepas

Para corroborar la identificación morfológica de los hongos y llegar a nivel de especie, las cepas fueron enviadas al laboratorio de Fitopatología del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), en donde por medio de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) las muestras de hongos fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Ver sección de Anexos).

El equipo utilizado para llevar a cabo la identificación molecular fue el siguiente:

- Secuenciadores automatizados 3130 y 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems).
- Termociclador Verty para PCR punto final (Applied Biosystems).
- Espectrofotómetro NANODROP 1000 (Thermo Scientific).
- Concentrador centrífugo (Eppendorf).
- Centrífuga (Hettich).

3.9. Evaluación

Se contabilizó el número de individuos desde que llegaban de campo, de estos se consideró individuos que murieron por la presencia de patógenos, según los síntomas y de aquellos que entraron en diapausa. Se tomó en cuenta en cada crecimiento micelial, la morfología que se presentó en cada larva y se agruparon

por la característica y color, de esta forma se procedió a agrupar para hacer la purificación correspondiente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Larvas sometidas a aislamiento de hongos

De las colectas realizadas en campos de algodón GM y de maíz, se colectaron las especies de Lepidópteros *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. virescens* y *H. zea*; estas especies fueron las que se establecieron para la determinación de los hongos, debido a que algunas de las larvas murieron en el traslado a las instalaciones de la UAAAN, y para no dañarlas y evitar contaminación, el material se consideró sólo a nivel Orden y Familia (Lepidoptera: Noctuidae).

La mortandad que se presentó en las larvas fue principalmente ocasionada por la presencia de patógenos y fue posible identificar a estos organismos por los síntomas que presentaban las larvas, desde la llegada a las instalaciones de la UAAAN, y durante el tiempo de purificación, por lo que se realizó un porcentaje estimado de la mortandad por las posibles causas de muerte, por tanto de 439 larvas que se almacenaron en refrigeración por mortandad, 111 correspondieron a la primer generación Filial que se tenía en cría y 328 a las larvas que murieron en el trayecto a la UAAAN, el material fue colectado en el ciclo P-V 2017 en cuatro colectas en la región de La Laguna, zona productora de algodón Bt; del total de larvas (439) el 23%, correspondió a la sintomatología que se relacionaba con virus, un 5% a la de bacterias, un 21% con la de hongos, 7%, venía parasitados y 44%, presentaron daño fisiológico debido a la adaptación a las condiciones artificiales.

De las larvas que presentaron sintomatología relacionada con hongos, se tomó una muestra de 72 larvas y de la sintomatología relacionada con bacterias fue una muestra de 18 larvas en total, las cuales se establecieron en 10 cajas Petri en cámara húmeda, 10 con PDA y antibiótico y 10 con PDA sin antibiótico (Fig. 17).

Posterior al aislamiento de los hongos y purificación de las cepas, se seleccionaron las cepas que tuvieron mayor representatividad y repetitividad; además, que fueron

más rápido en purificar, de esta forma fue posible determinar seis especies de patógenos asociados a larvas de noctuidos, recolectados en el cultivo de algodón GM o en cultivos aledaños (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica determinada para seis cepas de hongos aislados de larvas de lepidópteros colectadas en la región de La Comarca Lagunera, México.

Taxón	Número de especies de hongos aisladas de larvas de lepidópteros					
	1	2	3	4	5	6
Reino	Fungi		Fungi	Fungi	Fungi	Fungi
Subreino	---		Dikarya	Dikarya	Dikarya	---
Filum	Ascomycota		Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota	Basidiomycota
Sub filum	---		Pezizomycotina	Pezizomycotina	Pezizomycotina	Agaricomycotina
Clase	Eurotiomycetes		Sordariomycetes	Eurotiomycetes	Eurotiomycetes	Tremellomycetes
Sub clase	---		Hypocreomycetidae	Eurotiomycetidae	Eurotiomycetidae	---
Orden	Moniliales		Hipocreales	Eurotiales	---	Trichosporonales
Familia	Trichocomaceae		Nectriaceae	Aspergillaceae	Trichocomaceae	Trichosporonaceae
Género	<i>Aspergillus</i>		<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Byssochlamys</i>	<i>Trichosporon</i>
Especie	<i>Aspergillus flavus</i> (Link)	<i>Aspergillus niger</i> (Tieghem)	<i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg	<i>Penicillium desciscens</i> (Oudem)	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	<i>Trichosporon asahii</i>
Clave	Cosme, 2015	Rosas y Terán, 2015	Meléndez, 2015	Oudemans y Koning, 1902	Houbraken <i>et al.</i> , 2008	Sugita <i>et al.</i> , 1994

Todas las determinaciones de los hongos a nivel de especie fueron verificadas mediante marcadores moleculares, para lo cual se requirió de dos cajas Petrí con el aislamiento purificado de cada cepa, las cuales fueron enviadas al laboratorio de Fitopatología del IPICYT, los resultados se pueden visualizar en la sección de Anexos.

4.1. Descripción de los hongos identificados

4.1.1. *Aspergillus flavus* (Link)

La determinación de *A. flavus* se realizó observando las estructuras microscópicas características y la morfología del crecimiento en la caja Petri con PDA (Figs. 18 y 19), y la clasificación a nivel de especie se logró con la revisión de literatura y comparación, en este sentido, Cosme (2015), propone la clasificación taxonómica que se aprecia en el Cuadro 1.

Gil (2019a), menciona las características específicas que presenta este hongo, y que fue posible apreciar bajo el microscopio a 4, 10 y 40X, por tanto, dicho autor indica que este es un hongo que dentro de sus características microscópicas presenta un micelio septado con un conidióforo que mide de 400 a 800 micras de largo, de pared gruesa e hialino con aspecto rugoso; además, en su parte apical se encuentra una vesícula, la cual tiene forma globosa y mide de 25 a 45 micras de diámetro, de esta vesícula se generan las fiálides que tienen forma de botella, estas rodean toda la vesícula, las fiálides pueden presentar métula o no, con forma un tanto rectangular. A partir de las fiálides se desarrollan cadenas largas de conidios y estos con forma un tanto globosa de color verde amarillentos, de aspecto liso, pero al madurar se vuelven ligeramente rugosos.

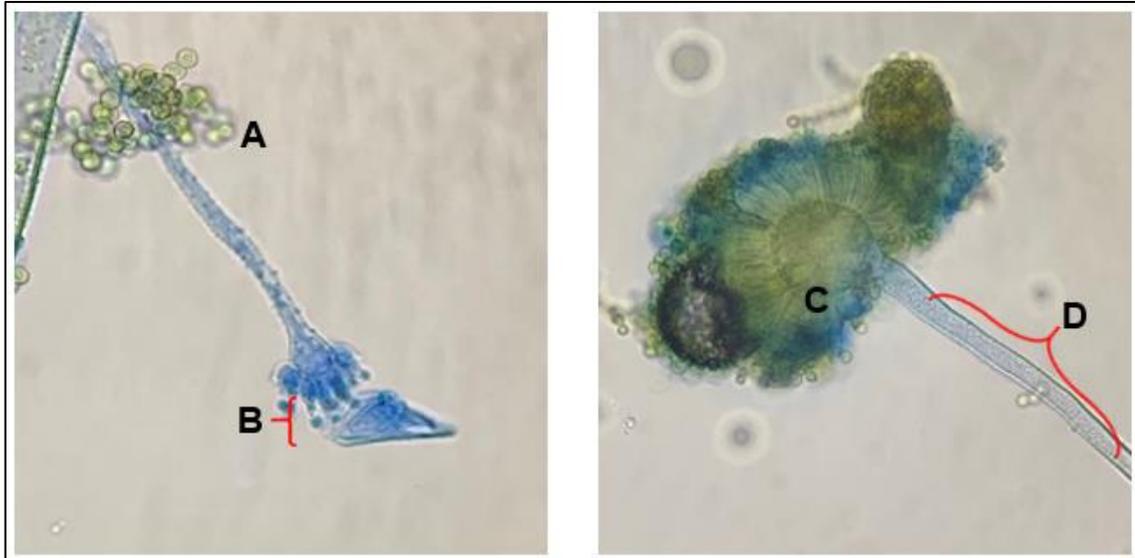


Figura 18. Estructuras reproductivas de *Aspergillus flavus*. A) Conidias. B) Fiálides. C) Vesícula. D) conidióforo. Imagen observada al microscopio a 10X.

En cuanto a sus características macroscópicas, es decir, su colonia; el mismo autor Gil (2019a), indica que este hongo puede presentar un aspecto que va desde granuloso, lanoso o polvoroso. El color de la colonia de igual forma puede tener variedad, al principio presentan un color amarillo para después tornarse de un color amarillo-verdoso y conforme va pasando el tiempo varía a colores más oscuros como marrón amarillento. Al reverso de la caja Petri presenta un color blanco a crema y a veces con ligeros puntos rojos que representan el punto de crecimiento de esclerocios de su fase teleomorfa; características que corresponden a lo observado en los aislamientos y purificación de este hongo.

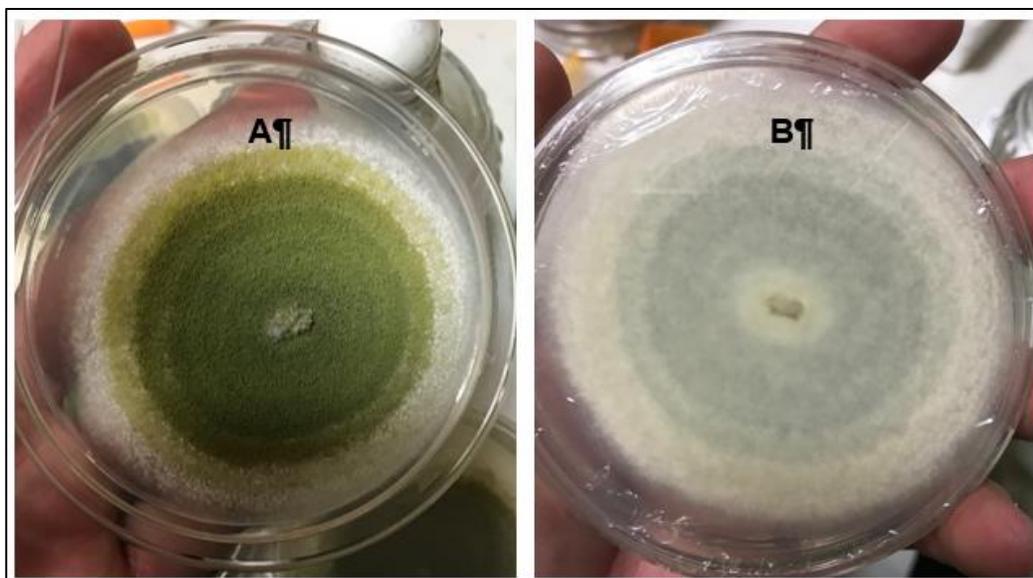


Figura 19. Crecimiento de *Aspergillus flavus* en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri.

Este es una especie de hongo que se encuentra distribuido en la naturaleza a nivel mundial, según lo que indican d'Halewyn y Chevalier (2016), y por lo general crece como saprófito en el suelo, aunque puede actuar como patógeno oportunista. A pesar de ser un hongo saprófito oportunista, este mismo tiene el potencial de ser entomopatógeno de larvas de lepidópteros, ya que mediante un estudio realizado por Karthi *et al.* (2018), concluyeron que *A. flavus* afecta el sistema inmunológico de larvas de *S. litura*.

Amaike y Keller (2011), citaron a *A. flavus* como un hongo saprofítico del suelo, el cual llega a infectar y a contaminar los cultivos de semillas antes y después de la cosecha con el metabolito cancerígeno secundario aflatoxina, además de que este mismo hongo se considera un patógeno oportunista animal y humano que puede llegar a ocasionar enfermedades como la aspergilosis.

Otros autores como Mazzani *et al.* (2004), mencionaron a *S. frugiperda* y a *H. zea* como vectores de *A. flavus*, ya que en un campo de maíz monitoreado durante ocho años el porcentaje de aflatoxinas fue incrementado cuando se duplicó el porcentaje de mazorcas con daños por estos lepidópteros. Por otra parte, Martínez *et al.*

(2013), indicaron que la producción de aflatoxinas en maíz que se encuentra en campo es favorecida por el estrés hídrico, altas temperaturas y lo más importante, por daños ocasionados al cultivo por parte del ataque de plagas insectiles pertenecientes a los géneros *Heliothis* y *Spodoptera*, por lo que puede estar relacionado la presencia de este patógeno en larvas de lepidópteros que son plagas del cultivo de maíz, lo que concuerda con esta investigación, ya que las larvas que se emplearon corresponden a noctuidos que son plagas de cultivos que se producen en La Comarca Lagunera, como algodón, maíz, sorgo y algunas hortalizas; género fúngico *Aspergillus* y, de éste, las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* son las más importantes porque producen aflatoxinas que provocan gran variedad de efectos tóxicos en seres vivos expuestos al grano contaminado (Martínez *et al.*, 2013).

4.1.2. *Aspergillus niger* (Tieghem)

Para el caso de *A. niger*, se determinó la especie mediante la visualización e identificación de las estructuras, bajo microscopio (Fig. 20) y por medio del crecimiento micelial (Fig. 21), con Rosas y Terán (2015) fue posible establecer la clasificación taxonómica a la cual pertenece este hongo (Cuadro 1).

Las características microscópicas son citadas por Gil (2019b), indicando que el hongo *A. niger* presenta un micelio septado, con un conidióforo de fuerte pared celular y liso o ligeramente granular de un color pardo o hialinos, los cuales miden alrededor de 1.5 a 3 milímetros de largo y en su parte apical se encuentra una vesícula de forma globosa, la cual mide aproximadamente 0.75 milímetros de diámetro, de un color oscuro o en su defecto hialino, aunque por lo general esta estructura no es observable frecuentemente bajo el microscopio, esto debido a la acumulación de conidios negros alrededor de esta, sin embargo, a pesar de haber observado estas estructuras bajo el microscopio en esta investigación, si fue posible llegar a la determinación de la especie, pues existen otras características típicas de esta especie, por ejemplo, las fiálides poseen forma de botella y rodean a toda la vesícula, con una métula de forma un tanto rectangular. Los conidios se desarrollan

en largas cadenas a partir de la vesícula y presentan variabilidad de forma que van desde globosos, subglobosos, elípticos, lisos, equinulados, verrugosos o con estrías longitudinales, pero todos presentan un color negro. Las características apreciadas en esta investigación para este hongo se corroboraron con lo observado bajo el microscopio a 10X (Fig. 20).

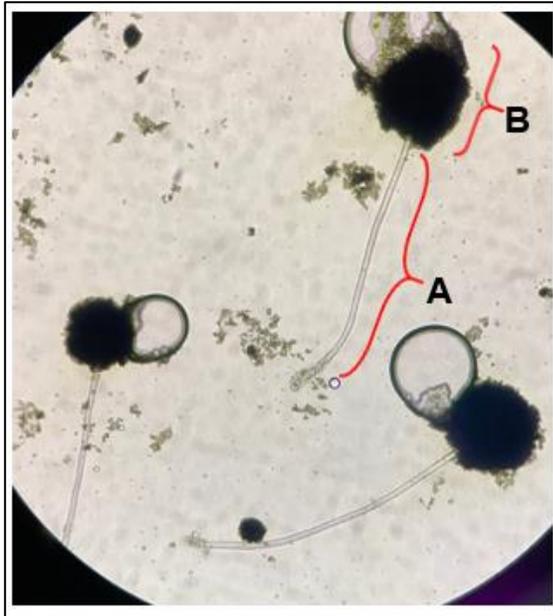


Figura 20. Estructuras reproductivas de *Aspergillus niger*. A) Conidióforo. B) Vesícula + conidios. Imagen observada al microscopio a 10X.

La visualización del crecimiento de este hongo en las cajas Petri, facilitó la determinación; Gil (2019b), indica que, dentro de las características macroscópicas, este hongo, puede crecer rápidamente y presentan un aspecto polvoriento (Figura 21). Al inicio de su crecimiento el micelio es de un color blanco, el cual, con el paso del tiempo y el desarrollo del hongo, este se va tornando oscuro hasta que concluyen en colores que van desde el negro azabache hasta un pardo oscuro. Al reverso de la caja Petri se puede observar el micelio de un color blanco (Fig. 21), el cual se va tornando negro con el tiempo, además de que se pueden observar estrías que se desarrollan desde el punto en donde fue sembrado el hongo.

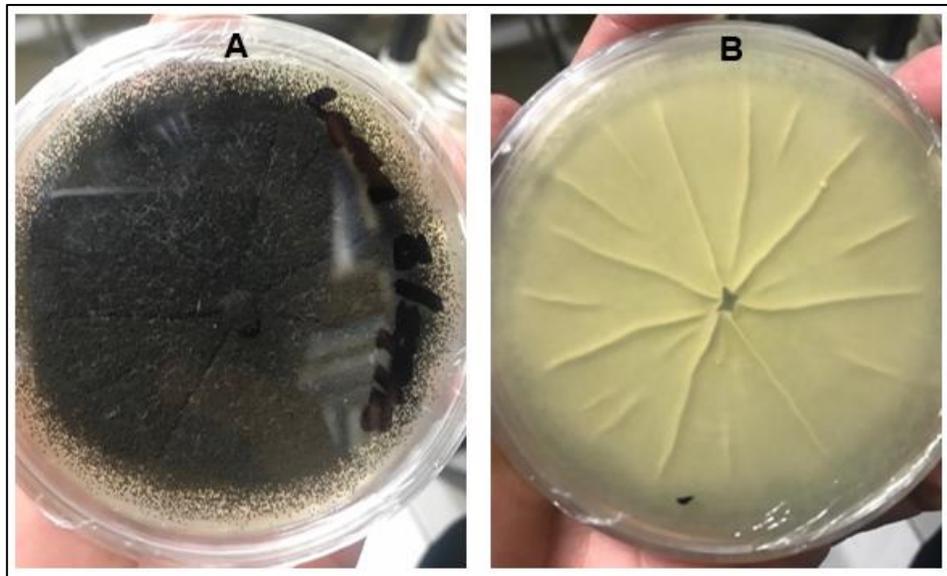


Figura 21. Crecimiento de *Aspergillus niger* en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri.

Es un hongo que se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, además de que se le considera como saprófito y patógeno oportunista (Gil. 2019b). De acuerdo a Draganova *et al.* (2013), este hongo es considerado como un patógeno débil de insectos y que en la mayoría de los casos actúa como saprófito después de la muerte de estos, además Su *et al.* (2014), citaron a *A. niger* como un contaminante muy común en las dietas artificiales de lepidópteros; es probable que en esta investigación, debido a la falta de higiene que se tiene durante las colectas en campo, las dietas que se les proporcionan a los técnicos no son manejadas adecuadamente, por lo que sí alguna de las larvas murió en el periodo en el que se realizó la colecta y la llegada a la UAAAN, por condiciones relacionadas a daño mecánico, alta temperatura o inanición por no consumir el alimento artificial, así como, por la misma sanidad de la larva, existe mucha probabilidad de que se haya contaminado o sido infestada por este hongo prolífero. Por lo que, para futuros trabajos se debe de considerar ser cuidadoso, del manejo de los insectos desde campo, pues al llegar este hongo a la cámara de cría de los lepidópteros, puede ser difícil eliminarlo y provocar un foco constante de infección. Sin embargo, cabe destacar que en un estudio realizado por Isogai *et al.* (1975), se reportó que *A. niger* posee una toxina denominada nigragillin, la cual resulta ser tóxica para larvas del

lepidóptero *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae), esto indica que *A. niger* realmente pueda llegar a comportarse como entomopatógeno para larvas de lepidópteros que fueron utilizadas en este experimento y no sólo como contaminante.

Kapoor y Viraraghavan (1997), estudiaron a este hongo como biorremediador ya que es capaz de eliminar metales pesados como plomo, cadmio y cobre de soluciones acuosas. Además, estos autores investigaron el papel desempeñado por varios grupos funcionales en la pared celular de *A. niger* en la bioadsorción de estos metales.

El hongo *A. niger* se reconoce como un hongo que produce micotoxinas, las cuales como ocratoxinas, y están relacionadas con la contaminación de alimentos y de cereales, al respecto Abarca *et al.* (1994), encontraron que algunas cepas de *A. niger* resultaron positivas para ocratoxina A (OA) aisladas de los alimentos, que produjeron OA en 2% de extracto de levadura, 15% de caldo de sacarosa y en cultivos de maíz.

4.1.3. *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg (=moniliforme)

Para el caso de la clasificación taxonómica de *F. verticillioides*, se corroboraron las características morfológicas, microscópicas, mediante montajes de las estructuras del hongo una vez que la cepa se encontró purificada, se realizaron comparaciones en la Web y se corroboró de acuerdo con National Center for Biotechnology Information (2015), citado por Meléndez (2015) (Cuadro 1).

Este hongo tiene hifas hialinas y septadas de donde nacen los conidióforos que pueden ser simples o ramificados con células monofiliadas y de una longitud media, es decir, más cortos que *F. solani* y más largos que *F. oxysporum*. Los microconidios de esta especie son muy abundantes y se originan en cabezas falsas (gotas de humedad en la punta del conidióforo) o en cadenas basipétalas que se originan en

conidióforos ramificados o en fiálides simples. Los conidios se presentan de forma oval, elipsoidal, fusiforme o clavada, con la base ligeramente aplanada, pueden tener de 0 a 1 septos y miden de 7 a 10 micrómetros de largo por 2.5 a 3.2 micrómetros de largo. Por otra parte, los macroconidios llegan a desarrollarse a partir de fiálides en hifas laterales, estos llegan a ser escasos y se presentan en una forma de hoz no muy curva, casi recta, con una pared delgada, y pueden llegar a presentar hasta un total de 3 a 7 septos, donde la célula apical es ligeramente curva y ahusada en el extremo, mientras que la célula basal presenta forma de pie. Los macroconidios llegan a tener medidas de 31 a 58 micrómetros de largo por 2.7 a 3.6 micrómetros de ancho (Fig. 22) (Reyes, 2001; Manrique, 2014).

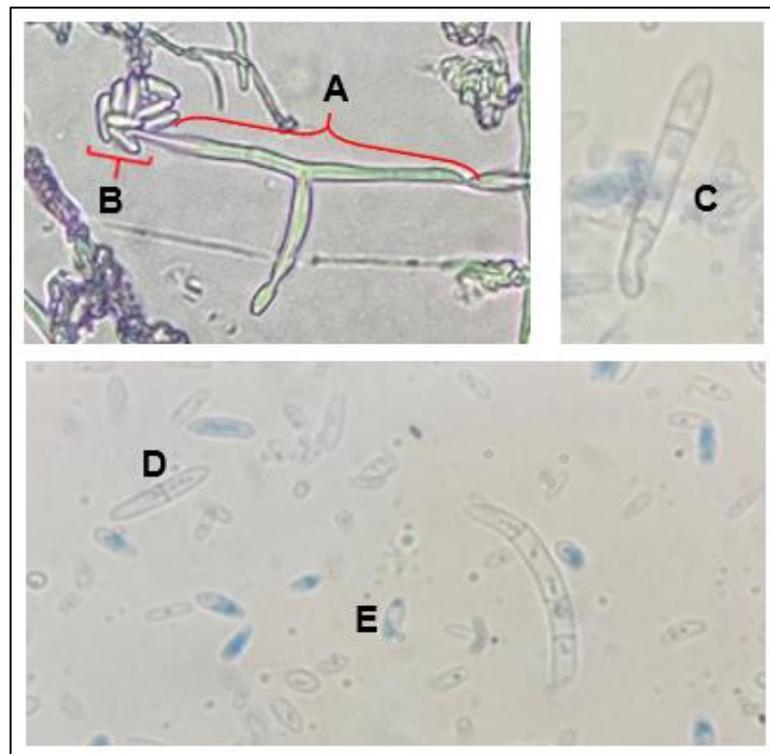


Figura 22. Estructuras reproductivas de *Fusarium verticillioides*. A) Conidióforo (vista a 10X). B) Falsa cabeza de conidios (vista a 10X). C) Macroconidia (vista a 40X). D) Microconidia con un septo (vista a 40X). E) Microconidia sin septos (vista a 40X).

La morfología macroscópica que presenta este hongo puede llegar a variar, según Reyes (2001) y Manrique (2014), esto depende del medio en el que se cultive este mismo. En esta investigación, con la finalidad de favorecer la esporulación del aislamiento y facilitar la determinación, se utilizó PDA + extracto de levadura con gentamicina, donde el crecimiento de la cepa, fue rápido tomando diferentes tonalidades en el color del micelio, y fue factible la esporulación. El micelio fue de aspecto algodonoso y por el frente de la placa, pudo apreciarse al inicio del crecimiento un color blanco cremoso y conforme pasó el tiempo este se fue tiñendo de un lado, lo que dio lugar a un semicírculo de color violeta, esta misma característica se presentó en todas las cepas que se tenían como copia del aislamiento (Fig. 23).

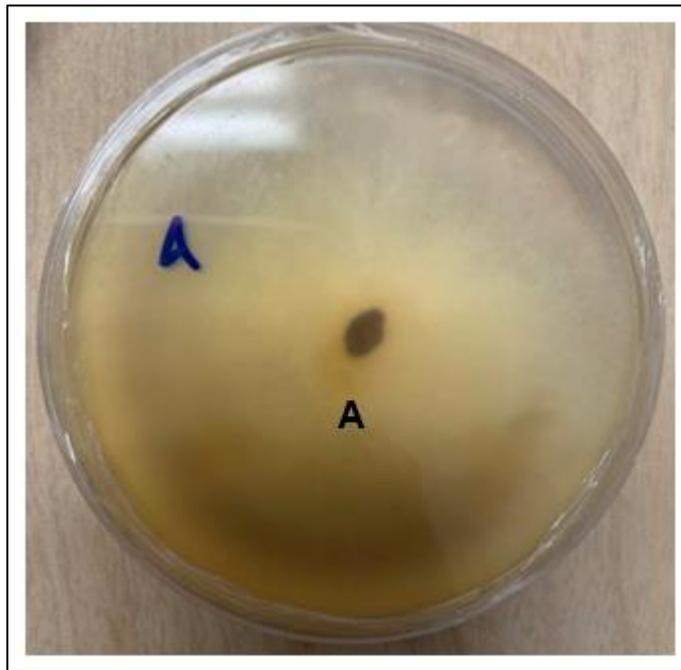


Figura 23. Crecimiento de *Fusarium verticillioides* en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Reverso de la caja petri.

Según Ramírez (2018), este hongo posee la característica de ser cosmopolita, por lo que puede encontrarse en casi todo el mundo, además no presenta algún hospedero en específico y es un patógeno no obligado, lo que quiere decir que no necesita de un ser vivo para obtener su alimento. Palmero (2008), menciona que

este hongo se le puede encontrar generalmente como parásito de muchas gramíneas, mientras que De la Torre *et al.* (2014), citaron a *F. verticillioides* como el principal hongo patógeno que afecta la productividad de maíz en el mundo, ya y llega a producir varias toxinas, de las cuales las fumonisinas son las principalmente excretadas por este hongo, estas mismas toxinas afectan al tejido y a los granos de maíz, lo que disminuye su calidad, además Schulthess *et al.* (2002), mencionaron que las fumonisinas promueven el cáncer de esófago en humanos y leucoencefalomalacia en caballos, estos mismos autores mencionaron que las plantas de maíz con presencia de fumonisinas están relacionadas con el ataque de plagas, dentro de las cuales se encuentran los insectos del Orden Lepidoptera, por lo que se les puede llegar a relacionar como vectores de este hongo. Darvas *et al.* (2011), indicaron que *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) y *O. nubilalis* son realmente vectores de *F. verticillioides* en el cultivo de maíz por lo que este hongo está en estrecho contacto con estos insectos.

Estudios realizados por Pelizza *et al.* (2011), presentaron el primer reporte de *F. verticillioides* como patógeno del chapulín *Tropidacris collaris* (Stoll) (Orthoptera: Romaleidae) y recientemente otro estudio realizado por Mosqueda *et al.* (2018), demostraron que *F. verticillioides* es patógeno del gusano cogollero (*S. frugiperda*) al aislarlo e identificarlo tanto a nivel morfológico como molecular, con estos estudios, se puede indicar que *F. verticillioides* puede comportarse como entomopatógeno de larvas de *S. frugiperda*, lo que concuerda con los aislados de este patógeno es en esta investigación; sin embargo, es necesario establecer los postulados de Koch, inoculando larvas de los lepidópteros colectados, para verificar que el comportamiento de este patógeno puede afectar larvas de este Orden, dicho estudio puede corroborarse en otras investigaciones complementarias, debido a que no fue posible por disponibilidad de material biológico establecerlo en este trabajo.

4.1.4. *Penicillium desciscens* (Oudem)

No existe mucha información relevante sobre la biología de este hongo; sin embargo, fue posible concretar la determinación del hongo, mediante el apoyo de caracteres observados bajo microscopio con una lente de 10X, y se corrobora con la literatura, en este sentido, Oudemans y Koning (1902) mencionan la clasificación taxonómica de *P. desciscens* (Cuadro 1); mientras que Loustau, (1950), describe las características microscópicas de este hongo, y las cuales fue posible apreciar en los montajes que se establecieron para el desarrollo de los resultado de esta investigación. Por tanto, *P. desciscens* presentan conidióforos que pueden llegar a medir de 80 hasta 800 micras y en algunas ocasiones puede llegar a presentar ramas divergentes. Los penicilos tienen tan solo cuatro métulas y estos llevan consigo verticilos de solo cuatro esterigmas de donde se desarrollan largas cadenas de conidios paralelos o divergentes, los cuales presentan forma elíptica o globosa y llegan a medir de 2.5 a 3.5 micras de diámetro y que fueron visibles en los montajes que se realizaron en esta investigación (Fig. 24).

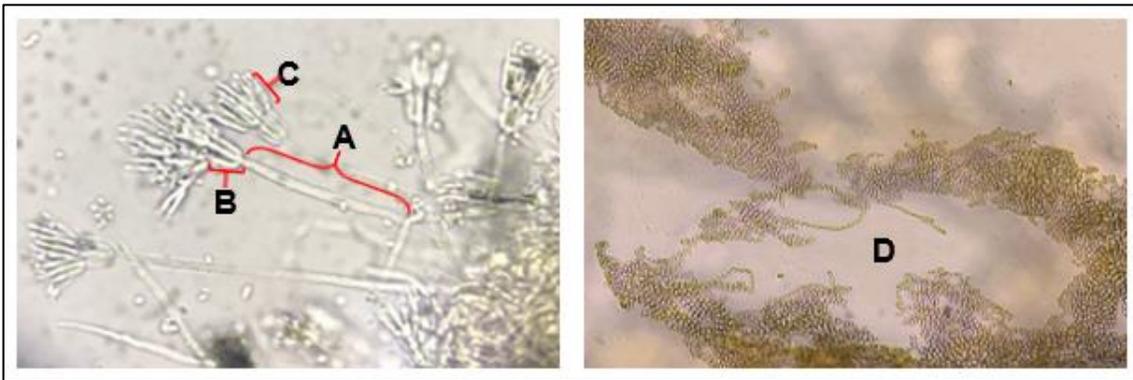


Figura 24. Estructuras reproductivas de *Penicillium desciscens*. A) Conidióforo. B) Métulas. C) Esterigmas. D) Cadenas de conidios. Imagen observada al microscopio a 10X.

Según lo que indica Loustau (1950), la colonia de este hongo, al inicio puede presentar un color verde grisáceo, verde azul o verde amarillo (Fig. 25). Al reverso puede llegar a presentar un color amarillo a anaranjado con pequeños puntos de un color ligeramente rojo.

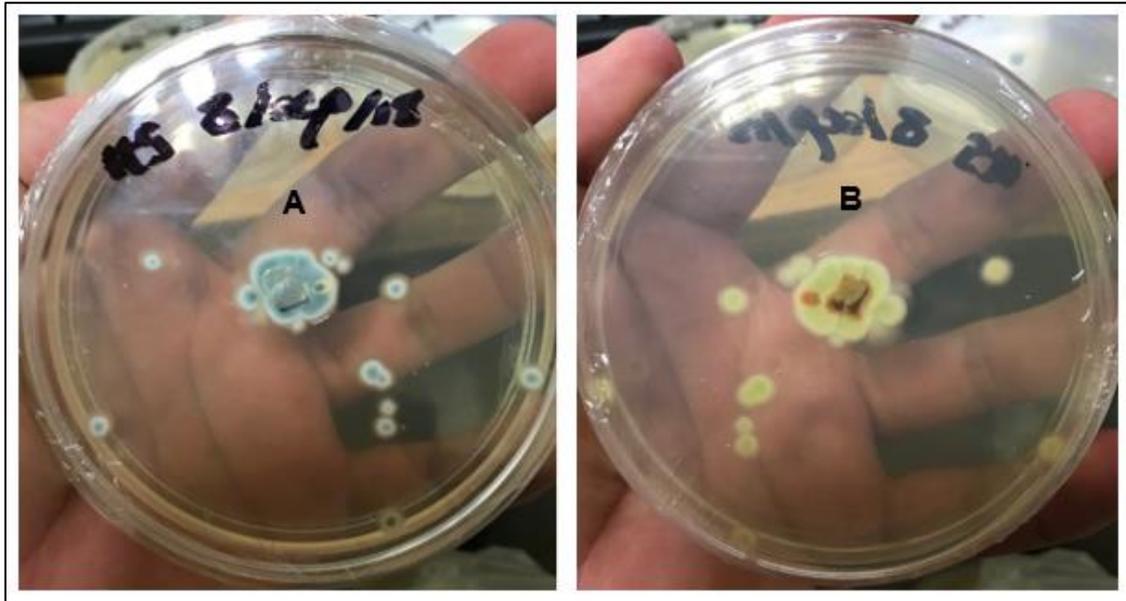


Figura 25. Crecimiento de *Penicillium desciscens* en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri.

Cabe destacar que *P. desciscens* no ha sido reportado en ningún estudio comportándose como patógeno de insectos, sin embargo, se puede mencionar que este hongo actúa como un hongo saprófito al desarrollarse en los cuerpos momificados de las larvas que fueron utilizadas para este trabajo, aunque, como se mencionó anteriormente, debido a la ausencia de algún estudio para este caso, la opción de que *P. desciscens* pueda llegar a comportarse como entomopatógeno no queda descartada, se requiere completar con pruebas inoculando larvas y ver la respuesta al patógeno.

4.1.5. *Byssochlamys spectabilis* (Udagawa & Shoji Suzuki)

La clasificación taxonómica a la que pertenece *B. spectabilis* es reportada por Houbraken *et al.* (2008) (Cuadro 1). Jamali y Banihashemi (2011) y Samson *et al.* (2009), indican que dentro de las características microscópicas de *B. spectabilis* presenta hifas que son septadas e hialinas, a menudo estas mismas obtienen una pared gruesa y ancha, los conidióforos nacen de estas mismas y estos pueden ser ramificados o no, en caso de que, si se presenten ramificaciones, estas tienden a

tener forma irregular, elipsoidal o cilíndrica. Los conidios nacen en cadenas y adquieren una forma ovoide a elipsoidal. Las clamidosporas por lo regular son terminales y poseen forma de “foco”, es decir, de globosa a elipsoidal, con una pared lisa o en algunos casos esta llega a ser ligeramente rugosa. Las ascosporas pueden llegar a formarse cuando su forma sexual (*B. spectabilis*) y asexual (*Paecilomyces variotii*) se encuentran en el mismo sitio, estas mismas presentan una forma elipsoidal con una textura lisa a ligeramente rugosa, las cuales llegan a medir de 5.5 a 6.5 micras de largo por 3.5 a 4.5 micras de ancho (Fig. 26).

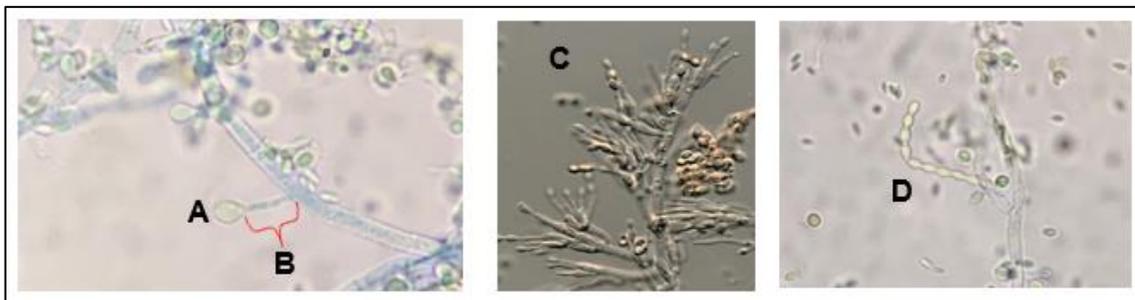


Figura 26. Estructuras reproductivas de *Byssochlamys spectabilis*. A) Clamidospora. B) Pseudohifa. C) Conidioforos. D) Conidios. Imagen observada al microscopio a 10X.

En cuanto a las características macroscópicas de *B. spectabilis* Samson *et al.* (2009), hacen referencia a que este hongo puede llegar a variar debido al medio de cultivo que se utilice. Para este trabajo se utilizó PDA + extracto de levadura con gentamicina, en donde al frente de la caja Petri se pudo observar un crecimiento micelial de color verde olivo, el cual presentó una textura algodonosa, además de que al centro pudo apreciarse un color verde más oscuro y alrededor de este mismo un color amarillo con pequeñas tonalidades de color blanco. Al reverso de la caja Petri el crecimiento micelial se presenta de un color amarillo pálido que cambia a verde oscuro conforme pasa el tiempo (Fig. 27).

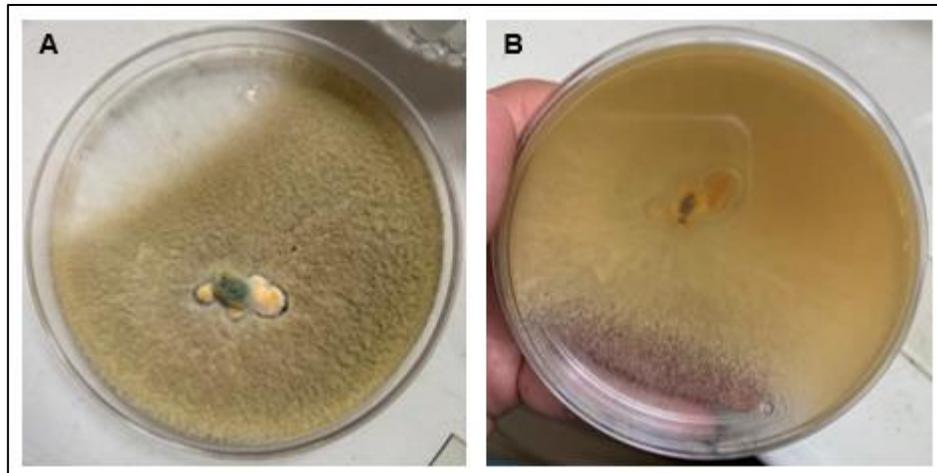


Figura 27. Crecimiento de *Byssosclamyces spectabilis* en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri.

B. spectabilis es un hongo cosmopolita y por lo general es común encontrarlo en el suelo, aire o el compost Samson *et al.* (2009). Houbraken *et al.* (2008), indican que este hongo es un contaminante importante en las comidas, debido a que sus ascosporas son muy resistentes al calor, por otra parte, Khiralla *et al.* (2016), aislaron cepas fúngicas endofíticas a partir de plantas medicinales, donde una de esas cepas fue *B. spectabilis*, posteriormente realizaron extractos de acetato de etilo de este hongo y encontraron que tienen una buena citotoxicidad, por lo que el extracto de *B. spectabilis* podría considerarse como una fuente citotóxica prometedora en el futuro para el descubrimiento de nuevos compuestos terapéuticos.

Hasta la fecha este hongo son pocos los estudios en los que se reporta a *B. spectabilis* como patógeno de insectos, por lo que este hongo podría comportarse como saprófito u oportunista. Cabe mencionar que Klyuchko y Koval (1981), encontraron larvas de lepidópteros siendo infectadas por la forma asexual de *B. spectabilis*, es decir, *Paecilomyces variotii* (Bainier) (Eurotiales: Thermoascaceae) y por otra parte Moorthi *et al.* (2015), demostraron mediante un estudio que *P. variotii* logró presentar patogenicidad ante larvas del gusano del tabaco (*Spodoptera litura* F.) (Lepidoptera: Noctuidae) del primer y segundo instar; con estos estudios

no se descarta que posiblemente el que provocó la infección y posterior muerte de las larvas en este trabajo de estudio pudo haber sido *P. variotii* y posteriormente este mismo pasaría a su estado sexual, el cual fue el hongo aislado, es decir, *B. spectabilis* como lo afirma Samson *et al.* (2009).

4.1.6. *Trichosporon asahii* (Akagi)

La clasificación taxonómica de este hongo se corroboró con lo que reportaron Sugita *et al.* (1994) (Cuadro 1). Por otro lado, Carnovale y Guelfand (2012) y Pinheiro (2015), mencionan que este hongo presenta hifas y pseudohifas, estas últimas tienen origen a partir de la gemación de los blastoconidios, son hialinas, elongadas y un poco alargadas, mientras que las hifas adquieren una forma cilíndrica, son alargadas, delgadas, hialinas y septadas, de estas mismas se originan los blastoconidios, artroconidios y clamidosporas. Las blastosporas por lo general son pequeñas y de forma esférica o un poco alargadas, pero sin brote lateral, mientras que las artrosporas nacen en cadenas y adquieren una forma característica de barril y con ausencia de células apesuradas. Las clamidosporas son generalmente intercalares, de forma redonda a ovalada, de pared gruesa y ligeramente rugosa (Fig. 28).

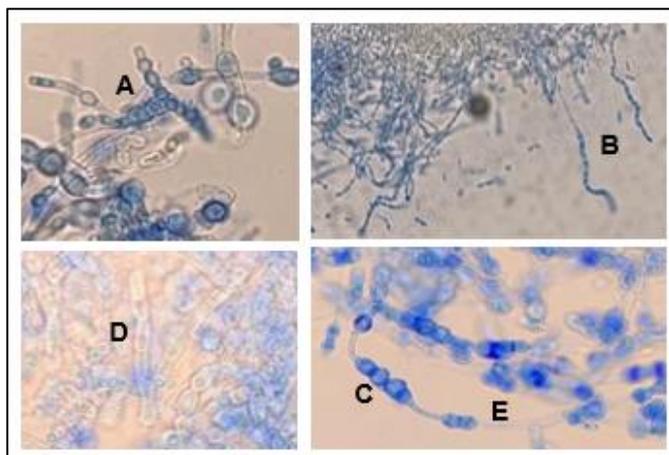


Figura 28. Estructuras de *Trichosporon asahii*. A) Blastosporas. B) Artrosporas. C) Clamidosporas. D) Pseudohifa. E) Hifa. Imagen observada al microscopio a 10X.

Las características macroscópicas pueden llegar a variar un poco, dependiendo del medio de cultivo que se utilice, para esta investigación se empleó PDA + extracto de levadura con gentamicina, con la finalidad de observar estructuras que facilitarían la determinación del hongo, por lo que el crecimiento micelial frente de la caja Petri se presentaba en forma de anillos concéntricos y de un color blanco, con topografía plana, con un aspecto polvoso y filamentoso, además de que presentaba estrías muy marcadas que podían apreciarse tanto al frente como al reverso de la caja Petri, estas crecían desde el punto del centro donde se sembró hacia los extremos. Al reverso de la caja Petri el crecimiento se presentaba de un color amarillo cremoso, lo que coincide con las características que reporta Pinheiro (2015) (Fig. 29).

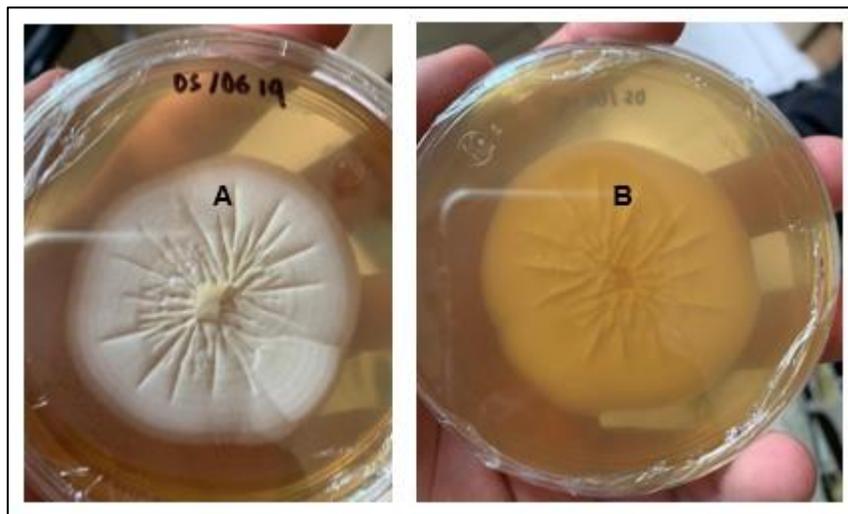


Figura 29. Crecimiento de *Trichosporon asahii* en medio de cultivo PDA + extracto de levadura con gentamicina. A) Frente de la caja Petri. B) Reverso de la caja Petri.

Pulpillo *et al.* (2001) menciona que *T. asahii* es un hongo cosmopolita, por lo que puede ser encontrado en casi todo el mundo en lugares como el suelo, el agua, e incluso forma parte de la flora normal de la piel del ser humano y del aparato respiratorio.

Di Bonaventura *et al.* (2006), citaron a *T. asahii* como el principal patógeno oportunista que causa la trichosporonosis en humanos, además Wolf *et al.* (2001),

menciona que las infecciones causadas por este hongo son raras, pero aun así se han asociado con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde la participación superficial en individuos inmunocompetentes hasta una enfermedad sistémica grave en pacientes inmunocomprometidos.

Chandran y Das (2010), descubrieron que *T. asahii* es un potente productor de biosurfactantes identificados como soforolípidos, así como un eficiente degradador de aceite diesel.

El hongo *T. asahii* no ha sido reportado aún en ningún trabajo de estudio como entomopatógeno para insectos del orden Lepidoptera, por lo que existe la opción de que este hongo pudiese comportarse como saprófito al desarrollarse sobre los cuerpos momificados de las larvas que fueron utilizadas para este trabajo, aunque, como se mencionó anteriormente, debido a la ausencia del algún estudio, la posibilidad de que *T. asahii* pueda llegar a comportarse como entomopatógeno para insectos del Orden Lepidoptera no queda descartada.

V. CONCLUSIONES

De los seis hongos que fueron aislados e identificados, tres de ellos *A. flavus*, *A. niger* y *F. verticillioides* tienen las características y el potencial como patógenos de larvas de lepidópteros, por lo que se demuestra que los cultivos GM con Bt no afectan el comportamiento de los microorganismos benéficos, en este caso hongos entomopatógenos de las plagas objetivo a dicha tecnología.

Los hongos *P. desciscens*, *B. spectabilis* y *T. asahii* se desconoce su rol como entomopatógenos, el presente estudio es un acercamiento para iniciar la investigación en estas especies, como potenciales entomopatógenos del Orden Lepidoptera.

La fase asexual de *B. spectabilis*, es decir, *P. variotii* presenta la posibilidad de que haya sido responsable de la muerte de las larvas de las cuales fue aislado y este mismo haya pasado a su fase sexual una vez aislado.

VI. LITERATURA CITADA

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G. y Cabanes, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(7), 2650-2652.
- Acosta, V. J. A. (2006). Evaluación de Hongos Entomopatógenos como Controladores Biológicos de *Scutigerella immaculata*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8259/tesis243.pdf?sequence=1>
- Alayo, A. E. P. y Wilson, K. J. H. (2014). Efecto de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre el ácaro *Panonychus citri* en condiciones de laboratorio. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 34(1), 42-50.
- Albuquerque, M. E. A. y Albuquerque, M. E. H. (2009). Hongos entomopatógenos: Importante herramienta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*. 5(6), 209-242.
- Amaike, S. y Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology*, 49, 107-133.
- Anónimo (2016). Control biológico: alternativa para mejorar la productividad ganadera. [Figura]. Recuperado de <http://monselibcas.blogspot.com/2016/03/>
- Bush, D. S., Lawrance, A., Siegel, J. P. y Berenbaum, M. R. (2017). Orientation of navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and adults toward volatiles associated with almond hull split and *Aspergillus flavus*. *Environmental entomology*, 46(3), 602-608.

- Caballero, P. y Williams, T. (2008). Virus Entomopatógenos. En J. J. Urbaneja, Control Biológico de Plagas Agrícolas (págs. 121-135). España: PHYTOMA-España. Recuperado de http://www.trevorwilliams.info/caballero_williams_fasciculo_2008.pdf
- Carrillo, R. M. T. y Blanco, L. A. (2009). Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Universitaria*, 19(2), 40-49.
- Castañet, M. C. y Moreno R. S. (2016). *Bacillus thuringiensis*: Características y uso en el control de *Aedes aegypti*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(3), 37-42.
- Chandran, P. y Das, N. (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Int J Eng Sci Technol*, 2(12), 6942-6953.
- ChileBio. (2018). Características modificadas de transgénicos. Santiago, Chile. *ChileBio*. Recuperado de <https://www.chilebio.cl/caracteristicas-modificadas-transgenicos/>
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). (2018). Análisis de sensibilidad y resistencia de lepidópteros asociados al cultivo de algodón transgénico. [online]. Recuperado de https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/prensa/actividades-SEjec/2018/C10/Comunicado-10_Dr.-B_Pereyra.pdf
- Cosme, R. J. A. (28 de mayo de 2015). *Aspergillus flavus*. Xalapa, México. *Micología Clínica Bioanálisis Xalapa*. Recuperado de <http://micologiaclinicabioanálisis.blogspot.com/2015/05/aspergillus-flavus-janeth-cosme-rivera.html>

- d'Halewyn, M. M. A. y Chevalier, P. (2016). *Aspergillus flavus*. Quebec, Canadá. *Institut national de santé publique Quebec (INSPQ)*. Recuperado de <https://www.inspq.qc.ca/en/moulds>
- Darvas, B., Bánáti, H., Takács, E., Lauber, É., Szécsi, Á. y Székács, A. (2011). Relationships of *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* and *Fusarium verticillioides* on MON 810 maize. *Insects*, 2(1), 1-11.
- de la Torre, H. M. E., Sánchez, R., D., Galeana, S. E., y Plasencia P., J. (2014). Fumonisin–Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77-91.
- Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'Antonio, D. y Piccolomini, R. (2006). Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(10), 3269-3276.
- Dively, G. P., Venugopal, P. D. y Finkenbinder, C. (2017). Field-Evolved Resistance in Corn Earworm to Cry Proteins Expressed by Transgenic Sweet Corn. *PLoS One*, 12(8): e0183637. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5560524/>
- Draganova, S., Takov, D., Pilarska, D., Doychev, D., Mirchev, P. y Georgiev, G. (2013). Fungal Pathogens on Some Lepidopteran Forest Pests in Bulgaria. *Acta Zoológica Bulgarica*, 62(2), 179-186.
- France, I. A., Cisternas, A. E. y Urtubia, H. I. (2016). Hongos entomopatógenos Microorganismos benéficos para el control de *A. nodipennis*. Recuperado de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR40445.pdf>

Gandarilla, P. F. L. (2012). Evaluación de Aislados Nativos de Hongos Entomopatógenos de Zonas Citrícolas sobre *Diaphorina citri* kuwayama (hemiptera: psyllidae). (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México. Recuperado de <http://eprints.uanl.mx/2802/1/1080237547.pdf>

Gil, M. (2019 a). *Aspergillus flavus*: características, taxonomía, morfología, enfermedades. *lifeder.com*. Recuperado de <https://www.lifeder.com/aspergillus-flavus/>

Gil, M. (2019b). *Aspergillus niger*: características, taxonomía, morfología y patologías. *lifeder.com*. Recuperado de <https://www.lifeder.com/aspergillus-niger/>

Gómez, L. L. B. (3 de julio de 2008). Virus Entomopatógenos. [Publicación en un blog]. El Agrónomo. Recuperado de <http://agronomord.blogspot.com/2008/07/virus-entomopatgenos.html>

Gómez, R. H., Zapata, G. A., Torres, A. E. y Tenorio, C. M. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Recuperado de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>

Gómez, R. H., Zapata, G. A., Torres, A. E. y Tenorio, C. M. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. [Figura]. Recuperado de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>

Hernández, A. A. (2016). Evaluación de Hongos Entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) para el Control de Hormigas Cortadoras de Hojas (*Atta* spp) en Eucalipto; Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla (Tesis de pregrado). Universidad Rafael Landívar, México, Chiapas. Recuperado de <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2016/06/17/Hernandez-Alex.pdf>

- Hou, S., Wu, F., Ma, S., Ma, R., Zhu, Y. y Wen, J. (2015). Valsa canker fungus plays an important role in *Euzophera pyriella* (Lepidoptera: Pyralidae) growth and development. *Oriental Insects*, 49(1-2), 25-35.
- Houbraken, J., Varga, J., Rico-Munoz, E., Johnson, S. y Samson, R. A. (2008). Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssochlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(5), 1613-1619.
- Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). (2015). Resistencia de insectos. CABA, Argentina. *IRAC Argentina*. Recuperado de <http://irac-argentina.org/resistencia-a-insectos/>
- INTAGRI. (2019). Los Entomopatógenos, Control Biológico de Plagas. *INTAGRI*. Recuperado de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/los-entomopatogenos-control-biologico-de-plagas>
- Isogai, A., Horii, T., Suzuki, A., Murakoshi, S., Ikeda, K., Sato, S., & Tamura, S. (1975). Isolation and identification of Nigragillin as an insecticidal metabolite produced by an *Aspergillus niger*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39(3), 739-740.
- Jamali, S. y Banihashemi, Z. (2011). First Report of *Byssochlamys spectabilis* as a Teleomorph of *Paecilomyces variotii* from Iran. *Rostaniha*, 12(2), 191-192.
- Jurat, F. J. L. (2014). Mechanisms of resistance to Cry toxins. Tennessee, U.E. *The University of Tennessee*. Recuperado de <http://web.utk.edu/~jurat/Btresistance.html>
- Kapoor, A. y Viraraghavan, T. (1997). Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource technology*, 61(3), 221-227.

- Karthi, S., Vaideki, K., Shivakumar, M. S., Ponsankar, A., Thanigaivel, A., Chellappandian, M., y Senthil, N., S. (2018). Effect of *Aspergillus flavus* on the mortality and activity of antioxidant enzymes of *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pesticide biochemistry and physiology*, 149, 54-60. doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.05.009
- Khiralla, A., Mohamed, I. E., Tzanova, T., Schohn, H., Slezack, D., S., Hehn, A. y Yagi, S. (2016). Endophytic fungi associated with Sudanese medicinal plants show cytotoxic and antibiotic potential. *FEMS microbiology letters*, 363(11), 1-8.
- Klyuchko, Z. F., & Koval, E. Z. (1981). Variations in the numbers of some massive species of noctuids (Lepidoptera) under the influence of entomopathogenic fungi in the Ukraine [Crop pest species; USSR]. *Entomological Review*.
- Loustau, G. M. J. (1950). Clave determinativa de las especies del género *Penicillium*. In *Anales de la Universidad de Murcia*. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones. Recuperado de <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/6407/1/N%2017%20%20Clave%20determinativa%20de%20las%20especies%20del%20genero%20Penicillium.pdf>
- Manejo de Resistencia de Insectos (M.R.I.). (2017). Programa M.R.I. CABA, Argentina. *Manejo de Resistencia de Insectos (M.R.I.)*. Recuperado de <http://www.programamri.com.ar/cultivos-bt/>
- Manrique, R. F. L. (2014). Caracterización Morfológica y Molecular de Aislamientos de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenber en Maíz (*Zea mays* L.) de Algunas Localidades de los Estados Aragua y Guárico de Venezuela (Tesis doctoral). Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. Recuperado de [http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/7776/1/T026800009735-0-
TESIS DOCTORAL. LORGIO-000.pdf](http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/7776/1/T026800009735-0-
TESIS DOCTORAL. LORGIO-000.pdf)

- Martínez, P. H. Y., Hernández, D. S., Reyes M. C. A. y Vázquez, C. G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126-146.
- Mazzani, C., Luzón, O. y Chavarri, M. (2004). *Aspergillus flavus* Asociado a *Epitragus* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) en Maíz Bajo Riego en Turén, Estado Portuguesa, Venezuela. *Entomotropica*, 19(3), 157-159.
- Meléndez, C. B. (2015). Control Biológico de *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* y *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg con Hongos Antagonistas Nativos del Valle de Toluca, México en Condiciones *In vitro* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/65653/Tesis%20Final%20bre-split-merge.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Menéndez, V. J. L. (2004). Características generales de los hongos. *Asturnatura.com*. Recuperado de <https://www.asturnatura.com/articulos/hongos/caracteristicas-generales-hongos.php>
- MICSA. (2018). Producto: Lecatrol. [Figura]. Recuperado de <http://micsagt.com/index.php/product/product/71>
- Mosqueda, A. J. A., Landeros, J. F., Ramírez, B. S., Santiago, B. M. Á., Vergara, P. S., Cervantes, C. J. A. y Esquivel, E. E. U. (2018). Hongos asociados a cadáveres de insectos plaga en el estado de Querétaro, México. *Scientia fungorum*, 47, 25-35.
- Oudemans, C.A.J.A. y Koning, C.J. (1902). Prodrome d'une flore mycologique obtenue par la culture sur gélatine préparée de la terre humeuse du Spanderswoud près de Bussum. *Archives Néerlandaises*, 7, 266-298.

- Palmero, L. D. (2008). Biogeografía y Patología del Género *Fusarium* en Ambientes Salinos y Semiáridos del Litoral Mediterráneo de España. (Tesis doctoral). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Madrid, España. Recuperado de http://oa.upm.es/1616/1/DANIEL_PALMERO_LLAMAS.pdf
- Pelizza, S. A., Stenglein, S. A., Cabello, M. N., Dinolfo, M. I y Lange. C. E. (2011). First Record of *Fusarium verticillioides* as an Entomopathogenic Fungus of Grasshoppers. *Journal of Insect Science*, 70, 1-8.
- Popova, T., Trencheva, K., Tomov, R. y Trenchev, G. (2010). Investigations on the microflora of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae) with a view to asses its significance like a carrier of pathogenic microorganisms. *Rasteniev'dni Nauki*, 47(4), 317-320.
- Portela, D. D. D., Chaparro, G. A. y López, P. S. A. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Ciencias biomédicas*, 11(20), 87-96.
- Portugal, B. M. (2011a). Bacterias Entomopatógenas. *Plaguicidas y Alternativas*. Recuperado de <http://plaguicidas-y-alternativas.org/contenido/2011-11-16-bacterias-entomopatogenas>
- Portugal, B. M. (2011b). Hongos Entomopatógenos. *Plaguicidas y Alternativas*. Recuperado de <http://plaguicidas-y-alternativas.org/contenido/2011-11-16-hongos-entomopat%C3%B3genos>
- Portugal, B. M. (2011c). Virus Entomopatógenos. *Plaguicidas y Alternativas*. Recuperado de <http://plaguicidas-y-alternativas.org/contenido/2011-11-16-virus-entomopatogenos>
- Pucheta, D. M., Flores, M. A., Rodríguez, N. S. y de la Torre M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.

- Ruiz, A. P., Conejo-mir, J. S., González, S. D. C., Ortega, M. N., & De Soto, I. P. (2001). Infección sistémica por *Trichosporon asahii*. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 92(7-8), 354-357.
- Ramírez, M. J. C. (2018). Manejo de *Fusarium verticillioidez* (Sacc) Nirenberg en Genotipos de Maíz (*Zea mays* L.) con *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y Cobre bajo Condiciones de Invernadero (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México. Recuperado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/45209/K%2065471%20Ramirez%20Morales%2c%20Juan%20Carlos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Recio, L. C. G. (2016). Nematodos, características y ejemplos. *Paradais Sphinx*. Recuperado de <https://invertebrados.paradais-sphynx.com/nematodos/nematodos-caracteristicas.htm>
- Reyes, V. W. P. (2001). Detección del Hongo *Fusarium verticillioides* y de Fumonisinias en Maíz y efecto de la Nixtamalización sobre la Producción de sus Hidrolizados (Tesis doctoral). Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. Recuperado de http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4549/Reyes_Velazquez_Waldina_Patricia.pdf?sequence=1
- Rosas, C. M. B. y Terán, F. D. F. (2015). Obtención de Ácido Cítrico a Partir de Melaza o Cachaza, Mediante Fermentación Utilizando Cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16888 (Tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/4483/1/03%20EIA%20377%20TESIS.pdf>

- Rossi, S. (Sin fecha). Entomopatógenos. Mendoza, Argentina. *CONICET MENDOZA*. Recuperado de <https://www.mendoza.conicet.gov.ar/portal//enciclopedia/terminos/Entomopat.htm>
- Sáenz, A. A. (2005). Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Palmas*, 26(2), 41-57.
- Samson, R. A., Houbraeken, J., Varga, J. y Frisvad, J. C. (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*, 22, 14-27.
- Schuler, T. H., Poppy, G. M., Kerry, B. R. y Denholm, I. (1998). Insect-resistant transgenic plants. *TIBTECH*, 16, 168-175.
- Schulthess, F., Cardwell, K. F. y Gounou, S. (2002). The effect of endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lepidopterous stemborers and coleopteran grain feeders. *Phytopathology*, 92(2), 120-128.
- Siegfried, B. D. (2001). Bt transgenic plants and the potential for resistance evolution. Nebraska, U.E. *AgBiosafety*. Recuperado de <http://agbiosafety.unl.edu/synopses/resistancets.htm>
- Sterling, C. A., Gómez, M. C. A. y Campo, J. A. A. (2011). Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) sobre *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae) en *Hevea brasiliensis*. *Revista Colombiana de Entomología*, 37(1), 36-42.
- Su, J., Wang, Y. C., Zhang, S. K. y Ren, X. B. (2014). Antifungal agents against *Aspergillus niger* for rearing rice leaffolder larvae (Lepidoptera: Pyralidae) on artificial diet. *Journal of economic entomology*, 107(3), 1092-1100.

- Suarez, D. (7 de abril de 2010). Hongo *Metarrhizium*. [Publicación en un blog]. Blogger.com. Recuperado de <http://hongometarrhizium.blogspot.com/>
- Sugita, T., Nishikawa, A. y Shinoda, T. (1994). Reclassification of *Trichosporon cutaneum* by DNA relatedness by the spectrophotometric method and the chemiluminometric method. *Journal of General and Applied Microbiology Tokyo*, 40(5), 397-408
- Tabashnik, B. E. (2015) ABCs of Insect Resistance to Bt. *PLoS Genet*, 11(11): e1005646. Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005646>
- Tabashnik, B. E., Brévault, T. y Carrière, Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6), 510-521.
- Tabashnik, B. E., Carrière, Y., Dennehy, T. J., Morin, S., Sistersona, M. S., Roush, R. T., Shelton, A. M. y Zhao, J. Z. (2003). Insect resistance to bt crops: Lessons from the First Seven Years. Canadá. *CornPest.ca*. Recuperado de <https://research.cip.cgiar.org/confluence/download/attachments/3443/Q7.pdf>
- Téllez, J. A., Cruz, R. M. G., Mercado, F. Y., Asaff, T. A. y Arana, C. A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 30, 73-80.
- Universitat d'Alacant (U.A.). (2019). Nematodos. Alicante, España. *Universitat d'Alacant (U.A.)*. Recuperado de <https://dcmba.ua.es/es/areas/botanica/nematodos.html>
- Urra, F. (2015). Hongos entomopatógenos como control de plagas de insectos. Santiago, Chile. *Museo Nacional de Historia Natural*. Recuperado de <http://www.mnhn.gob.cl/613/w3-article-52193.html?noredirect=1>
- Vargas, T. D. A. (2017). Efecto de la Aplicación de *Lecanicillium lecanii* sobre la Incidencia y Severidad de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el Cultivo de Café (*Coffea arabica*)

(Tesis de pregrado). Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica. Recuperado de

<http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3432/1/40419.pdf>

Vázquez, C. J. Y. (2019a). *Beauveria bassiana*: características, taxonomía, morfología, ciclo de vida. *lifeder.com*. Recuperado de <https://www.lifeder.com/beauveria-bassiana/>

Vázquez, C. J. Y. (2019b). *Metarhizium anisopliae*: características, taxonomía, morfología, modo de acción. *lifeder.com*. Recuperado de <https://www.lifeder.com/metarhizium-anisopliae/#Taxonomia>

Vázquez, C. J. Y. (2019b). *Metarhizium anisopliae*: características, taxonomía, morfología, modo de acción. [Figura]. Recuperado de <https://www.lifeder.com/metarhizium-anisopliae/#Taxonomia>

Wolf, D. G., Falk, R., Hacham, M., Theelen, B., Boekhout, T., Scorzetti, G. y Polacheck, I. (2001). Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *Journal of clinical microbiology*, 39(12), 4420-4425.

Yamoah, E., Jones, E. E., Suckling, D. M., Bourdôt, G. W., Walter, M. y Stewart, A. (2011). Using insects as potential vectors of *Fusarium tumidum* to control gorse. *New Zealand Entomologist*, 34(1), 5-11.

VII. ANEXOS

7.1. Anexo 1



30 de agosto de 2019

DATOS DE LAS MUESTRAS	
Cepas de hongos	
FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS	01-julio-2019

INFORMACIÓN DEL CLIENTE			
RAZÓN SOCIAL		RFC	
DOMICILIO		COL	
CIUDAD / ESTADO	Saltillo, Coahuila	CP	
TELÉFONO		FAX	
SOLICITA EL SERVICIO	Roberto de Jesús Hernández Robles		

SECUENCIACIÓN

Las muestras fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

EQUIPO UTILIZADO

- Secuenciadores automatizados 3130 y 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Termociclador Verity para PCR punto final (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro NANODRP 1000 (Thermo Scientific)
- Concentrador centrífugo (Eppendorf)
- Centrífuga (Hettich)

MÉTODOS RESULTADOS

Muestras	Resultado del Blast
2295- 1	<i>Trichosporon asahii</i>
2296- 2	<i>Aspergillus flavus</i>
2297- 3	<i>Aspergillus versicolor</i>



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.2. Anexo 2



2298- 4	<i>Fusarium verticillioides</i>
2299- 5	<i>Aspergillus niger</i>
2300- 6	<i>Aspergillus flavus</i>
2301- 7	<i>Byssoschlamys spectabilis</i>

2295-1_A11_22AGO19_SEC_2019-08-24

GTAAGTGTGCTTTATAGGCTTATAACTATATCCACTTACACCTGTGAACTGTTCTATTACTTGACGCAAGTCGAGT
 ATTTTACAAAACAAATGTGAATGAACGTCGTTTTATTATAACAAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCT
 CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
 GCAGCTTGGCTCTCTGGTATTCGGGAGAGCATGCCTGTTTCAGTGTGCATGAAATCTCTACCACTAGGGTTTCTAAT
 GGATTGGATTTGGGGCTCTGCGATCTCTGATCGCTCGCTTAAAAGAGTTAGCAAGTTTGACATTAATGTCTGGTGT
 AATAAGTTTCACTGGGACCATTGTGTTGATGCGTGCTTCAAACAACCGCTCGGACAATTACTTTGACTCTGGTCTGA
 AATCATGTAGGACTACCCGCTGGACTTATCCGTATGATCAACTACAGAAAACATTAGTGATTGCCTTTATAGGCTT
 ATAACTATATCCACTTACACCTGTGAACTGTTCTATTACTTGACGCAAGTCGAGTATTTTACAAAACAAATGTGAATG
 AACGTCGTTTTATTATAACAAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGACGCACTTGGGCTCTCTGGTATTCGGG
 AGAGCATGCCTGTTTCTGTGGCATGAAATCACACCACGAAGGGTTTCTAAAAAATTGGATTTGGGGCGCTGCCAAA
 TCTGAAGCTTGCTTAAAAAAGTTACACAATTTGACTTTAATGTCTGGGGTAAAAATACTTGCTTGCCCTTTTPTTG
 ACCAGGGGGT

Resultado del análisis del BLAST: *Trichosporon asahii*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Trichosporon asahii strain AYF-R4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1	1118	1629	96%	0.0	89.29%	KP162247.1
Trichosporon asahii partial 12S rRNA gene, strain AH16	1059	1910	95%	0.0	89.68%	LT714691.1
Trichosporon coremiforme strain 1FL1067 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	828	1374	93%	0.0	97.15%	MH920077.1
Trichosporon coremiforme strain DMc_165781 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos	828	1374	93%	0.0	97.15%	MH638931.1
Trichosporon coremiforme strain HBU047117 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos	828	1374	93%	0.0	97.15%	MF662365.1
Trichosporon coremiforme strain PD3612 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	828	1374	93%	0.0	97.15%	MF370976.1
Trichosporon coremiforme culture CBS 9963 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos	828	1374	93%	0.0	97.15%	KY105733.1
Trichosporon coremiforme culture CBS 2402 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos	828	1374	93%	0.0	97.15%	KY105732.1
Trichosporon coremiforme culture CBS 2646 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos	828	1374	93%	0.0	97.15%	KY105731.1
Trichosporon coremiforme strain YCH123 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	828	1374	93%	0.0	97.15%	KM862997.1



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
 Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
 San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.3. Anexo 3



2295-4_B11_22AGO19_SEC_2019-08-24

AAACTGTGGGCAGTCATACCTGATTTAGGCCAGAGTCAAAGTAATTGCTCTTGGCGACGATTAGAAGCAGCCTTCAA
 CACAATGGACCCAGTGAACCTTATTACACCAGACATTAATGTCAAACCTTGCTAACTCTTTAAGGCGAGCGATCAGA
 GATCGCAGACGCCAAATCCAATCCATTAGGAAACCCCTAGTGGTTGAGATTTTCATGACACTGAAACAGGCATGCTCTC
 CGGAATACCAGAGAGCGCAAGCTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCA
 ATTGCGTGGCTTCTCATCGATGCGAGAGCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTATTTGTTATAATAAACGAGG
 TTCATTACACATTTGTTGAAAAATACTCGACTTGGCTCAAGTAATAGAACAGTTCACAGGTGTAAGTGGATATAGT
 TATAAGCCTATAAAGGCAATCACTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAAATCATTAGTGATTGCCTTTATA
 GGCTTATAACATATCCCTTTCCCTGTGAAGTGTTCATTACTTGACGCAGTCGAGTATTTTTACCAACAATGTGTAA
 TGAACGTCGTTTTATTATAACAAAATAAAACTTTTCCAAAGGAATTTTGGGTCCCCCCCCCTAAAAACACAGCGCAAA
 TAATAAGAAAAGTGAAATAAAAATTTTGAGAACTAACTTCTGAACGGGGGCCGCCCTCAGATCAAAGAAACCTGC
 GGTGTGTGGAGAAAAAAGAACCTCAAAAAAGAATGAGTGGCCGCAAAAACCCACGACCCCCCCCCAA
 AAAAGAAGAGAAAAAATTATATTATTTGGGGGGGACAATGATTTCCCCCGGCCCTTTTTTTCAGGGTGCTTTTCT
 CACCCCCCACAATCCATTTTTTTTTTTTACCCCATAGTGAAAAAACCCCCACCCTTAAACCTATACGTTTTTCGA
 AGAAAAAAAAAAAA

Resultado del análisis del BLAST: *Trichosporon asahii*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Trichosporon asahi partial 13S rRNA gene strain AH16	942	1560	64%	0.0	92.18%	LT714691.1
Trichosporon coremiforme culture CBS 9963 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosor	928	1143	63%	0.0	99.41%	KY106733.1
Trichosporon coremiforme culture CBS 2482 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosor	928	1143	63%	0.0	99.41%	KY106732.1
Trichosporon coremiforme culture CBS 2546 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosor	928	1143	63%	0.0	99.41%	KY106731.1
Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene clone RF-OTU13	928	1143	63%	0.0	99.41%	AM901939.1
Trichosporon coremiforme CBS 2482 ITS region from TYPE material	924	1137	63%	0.0	99.41%	NR_073249.1
Trichosporon asahi strain CBS 13191C small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal R	922	1132	63%	0.0	99.22%	MH865842.1
Trichosporon faecale strain APBS:MLF112 13S ribosomal RNA gene partial sequence	922	1132	63%	0.0	99.22%	MG733760.1
Trichosporon coremiforme strain HRUM07117 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosor	922	1136	63%	0.0	99.22%	MF662356.1

2296-1_C12_22AGO19_SEC_2019-08-25

GGGTTCCAGGTGTAAGGGATCCTAGGCGAGCCCAACCTCCCACCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCC
 CGCCATTTCATGGCCGCGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCGCGCCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTG
 AAGTCTGAGTTGATTTGATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAGC
 CAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGG
 TATTCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTGTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCTCTCT
 CCGGGGGGACGAGCCCCAAGGGAGCGGGCCGACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTG
 TAGGCCCGCGCGCTTGGCGAACGCAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA
 ACTTAAGCATATCAATAACCGGAGAAATCTTTCGAGTGTGGGGTCCCAGCGAGCCCCCTCCACCCGGTTTCTAGA
 GCTCAAATGTGTCGGAGGGCCCCGTTTTGGAGGCCCGGGACTAAAACCGACGACCCCGCCG



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
 Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
 San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.3. Anexo 4



Resultado del análisis del BLAST: *Aspergillus sp.*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Aspergillus sp. strain DQ3 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1037	1217	89%	0.0	97.09%	MF808074.1
Aspergillus nomius strain DQ2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1037	1217	89%	0.0	97.09%	MF808072.1
Aspergillus sp. strain RW1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1031	1411	89%	0.0	96.94%	MG372022.1
Aspergillus sp. BAB-4665 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1031	1437	89%	0.0	96.94%	KP636465.1
Aspergillus flavus strain Beca_38 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1027	1174	89%	0.0	96.93%	KY234268.1
Aspergillus sp. AQG85_10 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1027	1291	88%	0.0	97.22%	KP721699.1
Aspergillus oryzae isolate J2-4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1027	1027	88%	0.0	97.22%	KF986445.1
Aspergillus nomius isolate SF49 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1026	1026	86%	0.0	97.51%	KR905619.1
Aspergillus flavus isolate AM_1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1022	1276	87%	0.0	97.20%	MK992234.1
Aspergillus flavus isolate S22 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1022	1022	87%	0.0	97.20%	MH664061.1

2296-4_D12_22AGO19_SEC_2019-08-25

```
GAACGGTGGTGAGCCGTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGGCC
TACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCCC
GGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGGAA
TACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCCG
TGCCTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGAC
TTCCTACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCATGAATG
GCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCTACACTCGGTAA
TGATCCTTCCGCAGGTCAACCTACGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGGCCCAACCCCCCCCCGGTGT
TTACCGTACCTTAGTTGCTTCGGGGGCCCGCCATTTCATGGCCGCGGGGGGCTCTCAGCCCCGGGGCCCGCCGGGAA
AAACCACAACCCCTCGAACTATGGAAGTCGAGTTGATGTTGCAATCGTTAAAACCTTCACAAGGGATTCTTGTTT
CCGGCCCCAAAAAACC CGCGAAAGGGAAAAACAGGGGAAAGGGAAATCCCGAAAAAACAAGCTTTTAAACCCATTG
CCCCCGGATATCGGGGGAGGCTGTCTCGGCCTTTTTCCCTTAGACAGGATGTGTGTGGTGTGCTCTCCCCCCCCG
CGGGGAGACCCAAAAGCGCGCGGACGCCCACTCTCATATATAGGGTGTCTCTCTCTCCGTGACAGCGCGGTG
CGCACAAAAATATCTTCTGTGTGTAATGCAGAAAGTAGTGAGACGAAGAGCTACACACGCAGTAATCGCGGATAG
AATACTACT
```

Resultado del análisis del BLAST: *Aspergillus flavus*



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.4. Anexo 5



Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Aspergillus flavus strain Bq5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	1212	1858	89%	0.0	96.13%	KF321065.1
Aspergillus flavus isolate MDERH2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	1160	1638	70%	0.0	93.47%	KY697107.1
Aspergillus tamarii strain BPWF17 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1155	1887	69%	0.0	93.65%	MF359724.1
Aspergillus sp. AQGW10 17 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1155	2161	69%	0.0	93.67%	KP721583.1
Aspergillus sp. SV03-11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1138	1536	70%	0.0	96.93%	FJ554485.1
Aspergillus flavus isolate Z9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	1136	1704	67%	0.0	95.47%	MK120514.1
Aspergillus tamarii strain MF24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1127	1673	69%	0.0	93.72%	MF359732.1
Aspergillus flavus strain CCTU145 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	1122	1599	67%	0.0	98.29%	MH750608.1
Aspergillus flavus strain Beca 79 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1120	1906	69%	0.0	96.63%	KY234276.1
Aspergillus flavus clone EF12 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1118	1632	69%	0.0	96.76%	MF767617.1

2297-1_C11_22AGO19_SEC_2019-08-24

ATAACCGGACGTGCGAGGCTGCCTCCGGGCGCAACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGAAG
 CCCTCTCGGGGGGAGCCGCCGGGACTACTGAATTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAATC
 AGTCAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAA
 TTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCCCCCTGGCATTCCGGGGGCATGCCTGTCCGAG
 CGTCATTGCTGCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCACCCCGGGGGACGGGCCGAAAGCGAGCGGG
 GGCACCTGTCCCGTCTCGAGCGCATGGGGCTTTGTGACCCGCTCGATTAGGGCCGGCCGGCCGACCGACTCT
 CCAACCATTTTTTTCAGGTTGACCTCGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGA
 AATTCATTACCGAGTGGGGGGGCCCCGGGCCCAACCCCGGGTACTACAAACACTGTTGCTCAGGGGAGCC
 CTCTCGGGGGGACCGCGGAACCTACCGAACTCCAGGGGAAAGTAACCGATCGATTGCGAA

Resultado del análisis del BLAST: *Aspergillus versicolor*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Aspergillus sp. SGE8 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1005	1342	94%	0.0	94.67%	JN709042.1
Fungal sp. RTS4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1000	1311	96%	0.0	94.39%	KF688119.1
Aspergillus sp. isolate SV1341 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	998	998	89%	0.0	96.26%	MH505473.1
Fungal sp. NUS10 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	983	1355	94%	0.0	94.44%	KF910774.1
Aspergillus versicolor isolate BAR-6580 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	981	1337	94%	0.0	94.17%	MF315902.1
Aspergillus versicolor isolate 777 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	981	1182	96%	0.0	95.36%	KT316749.1
Aspergillus creber strain DTO-178-H2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	972	972	79%	0.0	98.90%	KP329730.1
Aspergillus versicolor strain EPA 228 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	972	972	79%	0.0	99.90%	AY373081.1
Aspergillus sp. isolate 6574 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	968	1400	97%	0.0	93.03%	MG437322.1
Aspergillus creber genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain UTHSC 10-639	966	966	79%	0.0	98.72%	LN899690.1



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
 Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
 San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.5. Anexo 6



2297-4_D11_22AGO19_SEC_2019-08-24

GTTACAATCCCTGCGGCGTGCCTGATCCGAGGTCAACCTGAAAAAATGGTTGGAGACGTCGGCTGGCGCCCGGGCCG
 CCCTAATCGAGCGGGTGACAAAGCCCATGCGCTCGAGGACCGACACGGTGCCGCGCTGCCTTTCCGGGCCCGTCCCC
 CGGGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAAT
 GCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATCACTGAATTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCT
 GCGTTCTCATCGATGCCGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTTATATTACAGACTCAGACTGC
 ATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGCTCGCCCCGAGAGGGCTTCCCGCGAAGCAACAGTGTAG
 GTAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCGCCCGGAGGCAGCCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA
 GGTCAATTACCGGGGTGCGGGCGGCTCCGGCCCCCCTCCACCCGGGACTACCTAAAATGTGCTTCCGGGGAAGCC
 TCTCGGGGGCGACCGCGGGGACAATGAACTTTCTGCCGAGAGGGAGGCGGGGGGCTAACTAAAACCAACCAACCC
 ACCTTGGTCCGCTTCCGTCATACCAAATATGGGTTAGAAAGGACATGGAAAATCGGGAACAGGGGCTTACCCCTC
 GCCCTGGATATGGGGAAAAGTCCCCTGAGTCCATATGCCTCAGGGGTTCTATTGGCGCGCACCTCGGAGAGG
 CGTGGGAAACGACTCCAACACAC

Resultado del análisis del BLAST: *Aspergillus versicolor*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Aspergillus sp. isolate SIG-28 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA g...	1003	1254	73%	0.0	95.31%	MK269243.1
Trematoma matsutaka isolate F11, M small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal f...	1003	1440	71%	0.0	95.32%	MF037416.1
Aspergillus sp. SGE9 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete s...	977	1344	70%	0.0	94.54%	JN709042.1
Trematoma matsutaka isolate F19, M small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal f...	976	1361	71%	0.0	94.51%	MF037424.1
Aspergillus versicolor strain EPA 229, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene an...	970	970	59%	0.0	100.00%	AY373861.1
Aspergillus versicolor genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, isolate G211TES3C3	968	968	59%	0.0	100.00%	LN608956.1
Aspergillus creber genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain UTHSC 10-639	966	966	59%	0.0	99.81%	LN696690.1
Aspergillus creber genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain UTHSC 10-1227	966	966	59%	0.0	99.81%	LN696687.1
Aspergillus versicolor isolate F210 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g...	965	965	60%	0.0	99.44%	MG821400.1
Aspergillus sp. isolate LN89893, 1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g...	961	961	59%	0.0	95.62%	MK605880.1

2298-1_A01_28ago19_Sec_2019-08-28

GGGTTCCGAGCTTGAGCTCCCAACCCTGTGAACATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAACAAACGG
 GACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAAATAAAATCAAAACTTTCAACAA
 CGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCT
 TGGTGTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCCCAAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAA
 CCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC
 GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Resultado del análisis del BLAST: *Fusarium verticillioides*



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
 Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
 San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.6. Anexo 7



https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINKING=on&from=advanced&highlight=0&report=tblastn&seq_query=2298_4_B01_28ago19_Sec_2019-08-28

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Fusarium verticillioides isolate G4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	937	937	98%	0.0	99.61%	MK26433
Gibberella sp. FqcMV11 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	931	931	96%	0.0	100.00%	HG64730
Gibberella moniliformis strain RKSDPK-01 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	931	931	96%	0.0	100.00%	GU05530
Gibberella moniliformis strain SA3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	929	929	96%	0.0	100.00%	EU151482
Gibberella moniliformis strain CH11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	929	929	96%	0.0	99.22%	EU151475
Fusarium oxysporum isolate SF_4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	926	926	96%	0.0	99.80%	MK211247
Fusarium oxysporum f. cucumerinum strain WPI30-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8	926	926	96%	0.0	99.80%	MK16344
Fusarium mexicanum strain MXMIC-692 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	926	926	96%	0.0	99.80%	MG83805
Fusarium mexicanum strain MICMW-65-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	926	926	96%	0.0	99.80%	MG83805
Fusarium mexicanum strain MICMW-29-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	926	926	96%	0.0	99.80%	MG83805

2298_4_B01_28ago19_Sec_2019-08-28

GAATGGCCTGCTACATACCTGATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCACTA
 ACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAATTTGGGGAACGCGATTTGACTCGCGAGTCCC
 AACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTT
 CAAAGATTCCGATGATCACTGAATTCGCAATTCACATTACTATCGCATTTTCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAG
 AGATCCGTTGTTGAAAGTTTGGATTTATGTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCG
 GGCCGTCCTGTTTACCGGGAGCGGGCTGATCCGCGGAGCAACAATGGTATGTTTACAGGGGTTGGGAGTTGTAAC
 TCGGTAATGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGAAGATCATTACCGAGTTTACCCTCCCAACCCTGTGAACATCACTT
 TGTTGCTCGGCGGAACAGCCCGCTCCCGGAAAAACGGGAGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTTTTTTTTATATGTAAC
 TTCGGGGGAACACCATAAATAAATTTTTTCAACAGCGGTTTGGTTTTTTCGGGCTTAAAAAAAACCCGCAAGGGGAAG

Resultado del análisis del BLAST: *Fusarium verticillioides*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Fusarium verticillioides isolate FM13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal R	1122	1634	92%	0.0	96.61%	MK750049.1
Fusarium verticillioides isolate FM2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	1109	1605	92%	0.0	96.85%	MK750042.1
Fusarium verticillioides isolate FM15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal R	1086	1525	91%	0.0	97.50%	MK750051.1
Fusarium fujicuroi isolate FFS3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1038	1376	92%	0.0	96.81%	MH004746.1
Gibberella moniliformis genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, and 26S rRNA gene, strain DBT-112	1035	1377	91%	0.0	98.32%	HF570008.1
Fusarium verticillioides strain CGARF-013 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	1013	1013	84%	0.0	96.29%	KY495190.1
Fusarium oxysporum isolate MM2-EGY internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and i	1011	1011	85%	0.0	95.90%	KY073256.1
Fusarium oxysporum isolate MM3-EGY small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosom	994	994	85%	0.0	95.26%	KY073257.1
Fusarium sp. AS333 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transc	990	990	75%	0.0	97.44%	KU382538.1
Fusarium oxysporum isolate MM1-EGY internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and i	989	1366	92%	0.0	95.25%	KY073255.1



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
 Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
 San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.7. Anexo 8



2299-1_C01_28ago19_Sec_2019-08-28

GATACGGAGGTGCGAGGTACTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTT
 GTCGGCCGCGGGGGGGGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTCCCGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCG
 TGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAAAACGCAGC
 GAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAAGATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGACGCACATTGCGCCCCCTGGTATCCGG
 GGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGATTGTGTGTTGGGTCGCCGTACCGCTCTCCGGGGGAAC
 GGGCCCGAAAGGCAGCGTCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTACGATTGGCCGG
 CGCCTCCGACGTTTTCCAACCATCTTTCCAGTTGACCTCGGATAGGCATACCCGCTGAACCTTATCCATATCAAT
 AACAGAGAAAATTACCGAGTCCGGTCTTTGGGCCAACCTCCCATCCATGCTGTAGTACCCAGTTGCTTCGGCGGGCC
 CGCCACTTGTCCGCCCGGGGGGAGCCACTCCCCACGGGCC

Resultado del análisis del BLAST: *Aspergillus niger*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Aspergillus tubingensis strain Hobas-41 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1096	1283	98%	0.0	96.01%	KC020120
Aspergillus niger voucher MSR4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1079	1412	99%	0.0	94.97%	KJ881377
Aspergillus niger isolate bendaryD small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1072	1375	99%	0.0	95.43%	MK88674
Aspergillus niger isolate SS5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1072	1375	99%	0.0	95.43%	KJ432863
Aspergillus niger Y1 A1 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	1068	1068	98%	0.0	95.02%	LC496500
Aspergillus niger voucher MRC200804 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1066	1366	99%	0.0	95.54%	MF07865
Aspergillus niger strain MBL1511 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1066	1536	99%	0.0	94.78%	KP17247
Aspergillus niger small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1062	1224	99%	0.0	95.53%	MH34118
Aspergillus niger strain AHBR12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1062	1224	99%	0.0	95.25%	KF30575

2299-4_D01_28ago19_Sec_2019-08-28

AGGAAGTTAGAAGATATGGGACCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAGAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGC
 CAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCC
 CCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGACAGGCATGCCCCCG
 GAATACCAGGGGGGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTACATTAGTTATCGATTTCGCT
 GCGTTCTTATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCATCAATCAACTCAGACTGCACGCT
 TTCAGACAGTGTTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGGCCGGGGGCGAGAGCGCCCCCGGGCGCCGACAAAGC
 GGCGGGCCCGCGAAGCAACAGGGTACAATAGACACGGATGGCGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATC
 CTTCCGACGGTACCCTACGGAAGATTATTAGTGAGGGTCTTTGGTTCCAACCTCCCCCCTGTCTGTGTAACCGCCG
 GTTCCGTCGGCCCGCCCTCGGCTTGTTGGGGGGCGGGGGGGCCCCCGCCCCCGGGCGCCGGCCGCGGAAACCC
 CAAACAAAACGGTCGGAAGGGGGAGGTGGGTTTGTAAATCATTCTTAAACCTTTTCCGGGGGACCCCGGTTCCGGAA
 AAAAAAAAAAGGGGAAATTGGAAACGAAAGGGAAAA

Resultado del análisis del BLAST: *Aspergillus niger*



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
 Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
 San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.8. Anexo 9



Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Aspergillus niger isolate WF small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1050	1050	71%	0.0	98.16%	MH960760.1
Aspergillus niger strain MM11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1042	1239	85%	0.0	97.11%	MH081025.1
Aspergillus niger voucher MRC200804 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1042	1228	72%	0.0	97.70%	MF078655.1
Aspergillus niger isolate LRM 134 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1040	1040	67%	0.0	100.00%	MK457457.1
Aspergillus niger strain TA01-24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1040	1040	67%	0.0	100.00%	KP748368.1
Aspergillus niger strain ES-A5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1040	1040	67%	0.0	100.00%	HQ285532.1
Aspergillus niger isolate KUASR4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1037	1037	67%	0.0	99.82%	MN187242.1
Aspergillus niger strain CMXY2352 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1037	1037	67%	0.0	99.65%	MG991581.1
Aspergillus tubingensis strain MS7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1037	1390	85%	0.0	92.85%	MG561279.1
Aspergillus niger voucher MSR3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1037	1169	67%	0.0	100.00%	KJ881376.1

2300-1_E01_28ago19_Sec_2019-08-28

GGCCAGATAATACCGATTCTTTCGCGAGCGAGTCGCCTCACACCGTGTCTTCTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGACAA
 TAATGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCGCGCCGCGGAGACACCAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCT
 GAGTTGATTGATCGCAATCAGTTAAAACCTTCTCCAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGC
 GATAACTAGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCCTGGTATTCGGGGGGGC
 ATGCCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGTCGCCCTCTCCGGGGGGGGGGC
 CCAAAGGCAGCGCGGCACTTGTGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCCGGCC
 TTCCGGAACGCAAAATCAATCTTTTTCAGGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGC
 GGAGAAATTT

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Aspergillus oryzae strain ASP7 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	889	889	96%	0.0	95.70%	MG846220
Aspergillus flavus isolate K3 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	883	883	95%	0.0	95.83%	MN179256
Aspergillus oryzae genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2 isolate TUHT36	883	883	95%	0.0	95.68%	LN482462
Aspergillus oryzae strain SCIM6 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	883	883	95%	0.0	95.83%	KJ650330
Aspergillus oryzae strain UPM.A27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	883	883	94%	0.0	96.16%	HM145964
Aspergillus flavus isolate T13 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	881	881	94%	0.0	95.99%	MN179300
Aspergillus flavus isolate KM2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	881	881	94%	0.0	95.99%	MN179295
Aspergillus oryzae isolate 60 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	881	881	93%	0.0	96.47%	MH345800
Aspergillus flavus isolate 30 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	881	881	93%	0.0	96.47%	MH345870
Aspergillus bombycis strain MHFRKY1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	881	881	93%	0.0	96.32%	MF092812

2300-4_F01_28ago19_Sec_2019-08-28

GAAAATATTGGGATGCCTAGCTCTGAGGTCACATGAGAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCTCCAGAG
 CGGGTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCCGCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGG
 GGACGACGACCAACACACAAGCCGTGCTTGTGGGACGAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCGAGG



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
 Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
 San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.9. Anexo 10



GGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAG
AGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCCCGGAAGCA
ACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACC
TACGGAAG

Resultado del análisis del BLAST: *Aspergillus flavus*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accessi
Aspergillus flavus strain S1310 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA ge	987	987	95%	0.0	99.45%	KX090331
Aspergillus flavus isolate L20 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, ger	983	983	95%	0.0	99.27%	MH23768
Aspergillus flavus isolate L20 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, ger	983	983	95%	0.0	99.26%	MH23768
Aspergillus flavus isolate S4 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, ger	983	983	95%	0.0	99.27%	MH23768
Aspergillus flavus strain JQFD4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA ge	983	983	95%	0.0	99.45%	MG58950
Calocylbe indica small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete a	983	983	95%	0.0	99.27%	MF45966
Aspergillus flavus strain ND41 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA, ger	983	983	95%	0.0	99.26%	MG65967
Aspergillus flavus MIPS3 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	983	983	95%	0.0	99.27%	LC325161
Aspergillus flavus isolate Z1106 251 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, _	983	983	95%	0.0	99.27%	KJ175428
Aspergillus flavus isolate M.9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comple	983	983	95%	0.0	99.26%	KJ175419

2301-1_E11_22AGO19_SEC_2019-08-25

GAATACTAACGTGAGAGACCTCGAGGCCAACCTCCCATCCGTGTTGTTAAACACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCG
TGGTTACGCCGTGGCCGCCGGGGGGCATCTCGCCCCGGGCCCGCGCCGCGAAGACCCCTCGAACCTGCCTTGAA
GGTTGCCGTCTGAGTATGAAATCAATCGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCGCCCT
GGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAACCTCCAGCCCGGCTGGTGTGTTGGGTCGACGTCCTCC
CCGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGCGCGCGCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACGCGCTCTGGT
AGGGTCGGCCGGCTGGCCAGCCAGCGACCTCACGGTCACCTATTATTTTCTCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAACCGGAGGAA

Resultado del análisis del BLAST: *Byssoschlamys spectabilis*



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

10

7.10. Anexo 11



Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per ident	Accession
<i>Paecilomyces</i> sp. JCM 12845, gene_26S D1/D2 regions and intergenic spacer regions	1033	1033	98%	0.0	99.13%	AB217857.1
<i>Byssoschlamys spectabilis</i> strain GZMS-11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1031	1031	98%	0.0	99.13%	KT824780.1
Uncultured fungus clone R061211 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	1031	1031	98%	0.0	99.13%	GU256957.1
<i>Paecilomyces formosus</i> strain NZD-mf176 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed	1018	1016	98%	0.0	98.61%	KM277979.1
<i>Paecilomyces</i> sp. BAB-4427 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	1016	1016	97%	0.0	98.61%	KR154912.1
<i>Byssoschlamys</i> sp. strain TC203 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1011	1011	96%	0.0	98.94%	MK465185.1
<i>Paecilomyces formosus</i> isolate CGMCC 3.15056 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	1003	1003	92%	0.0	100.00%	MH459158.1
<i>Paecilomyces</i> sp. JCM 28097, genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence	1000	1000	94%	0.0	99.28%	LC133789.1
<i>Paecilomyces formosus</i> strain NZD-mf185 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcriber	1000	1000	94%	0.0	99.28%	KM277979.1
<i>Paecilomyces formosus</i> CBS 950.73B ITS region, from TYPE material	1000	1000	94%	0.0	99.28%	NR_149329.1

2301-4_F11_22AGO19_SEC_2019-08-25

GGATACGACTGCTTCCGAGCGTGACTGATCCGAGGTCAACCTAAGAGAAAAAATAGGTGACCGTGAGGTGCGCTGG
 CTGGCCAGCCGGCCGACCCTACCAGAGCGCGTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGGCCGCGCTGC
 CTTTCGGGCGCGTCCCCGGGGGGGACGTCGACCAACACACCAGCCGGGCTGGAGGGTTAGCAATGACGCTCGGACA
 GGATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTACGGAATTCGCAATTCACATT
 ACTTATCGCATTTCGCTCGGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAATTTTAAACGATTGAATTT
 CATACTCAGACGGCAACCTTCAAGGCAGCGTTCGAGGGCTTTCGGCGGGCGGGGCCCGGGCGAGATGCCCCCGG
 CGCCCGCCCGGTGAACACCGCGGGCCCGCCGAGCAACAGGTGTTTAAACAACACGGATGGGAGGTTGGCGCTCGAG
 GGACCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAGGTCATTACCGGGGAGGGTCCCGAGGCCACCT
 CCCATCCGGTTGTTAAAACCTGTTGCTCGGGGGCCGGGGGTTCAAGCGGGGGCGGGGGGCTCTCCCCGGCC
 CGCGCCCGCGAAAAACCCCTCGAACCGCGCCCTGAAGGTGCCCGCGAGTTTAAAATTCAGGTTAAAAATTTAAA
 AAGGACCTTTTTTTTCGGCCAAAAAAAACCGCGAAATCAAAAAAAGGGATGTTTAAATTCGGGAATTTAAA
 TTTTTTAGCCCTTGGCCCCGGGATTTGGGGGGGGCCCTCTCGGGGATTTTCTACCCCCCCCCGGGGGGGGG
 GGGTGGGGGCCCCCCCCCGGGGGGGAGCTAAAAGGGAGGGGGGGCCCCCCCCCCCCCATCATCAATGTGTG

Resultado del análisis del BLAST: *Byssoschlamys spectabilis*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per ident	Accession
<i>Paecilomyces</i> sp. JCM 28097, genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence	1046	1046	55%	0.0	100.00%	LC133789.1
Uncultured fungus clone R061211 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	1046	1046	55%	0.0	100.00%	GU256957.1
<i>Paecilomyces</i> sp. JBL 03195 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	1046	1046	55%	0.0	100.00%	DQ682589.1
<i>Paecilomyces</i> sp. JCM 12845, gene_26S D1/D2 regions and intergenic spacer regions	1046	1046	55%	0.0	100.00%	AB217857.1
<i>Byssoschlamys spectabilis</i> strain GZMS-11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ge	1044	1044	55%	0.0	100.00%	KT824780.1
<i>Paecilomyces</i> sp. BAB-4427 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	1042	1042	56%	0.0	99.82%	KR154912.1
<i>Paecilomyces formosus</i> genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain IFM 62697	1035	1035	55%	0.0	99.65%	LC317710.1
Fungal sp. SNE-CNT5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	1031	1031	56%	0.0	99.47%	KJ023738.1
<i>Paecilomyces</i> sp. 10.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	1027	1027	55%	0.0	99.47%	KR610365.1
<i>Byssoschlamys</i> sp. strain TC203 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1016	1016	55%	0.0	99.46%	MK465185.1



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
 Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
 San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

7.11. Anexo 12



Nota importante: Este informe no puede ser reproducido sin la aprobación del laboratorio por escrito y solo puede reproducirse en su totalidad y no parcialmente. Los datos y resultados en este informe corresponden exclusivamente a las muestras que se describen en él y son válidos únicamente bajo las condiciones especificadas en las que se realizó el ensayo. Cualquier duda o aclaración sobre este informe comunicarse con el Dr. Ángel G. Alpuche, correo electrónico alpuche@ipicyt.edu.mx o al teléfono 01 444 8342000 ext. 2080

QFB Elvira Hernández Rico
Técnico SBM
Responsable del análisis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Jefe de LANBAMA
Autoriza

Final del informe



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, MÉDICA Y AMBIENTAL
Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a sección, CP. 78216
San Luis Potosí S.L.P., Tel.: (444) 834 20 00, www.ipicyt.edu.mx

12