

# DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Metarhizium* spp. DE LA ZONA CAFETERA COLOMBIANA

Adriana Gisela Rosillo Guerrero\*, Patricia Marín Marín\*\*, Narmer Fernando Galeano Vanegas\*\*\*, Alvaro León Gaitán Bustamante\*\*\*\*

**ROSILLO G., A. G.; MARÍN M., P.; GALEANO V., N. M.; GAITÁN B., A. L. Diversidad genética de *Metarhizium* spp. de la zona cafetera colombiana. Revista Cenicafé 69(1):55-67. 2018**

La estimación de la diversidad es un factor determinante para conservar y aprovechar los recursos genéticos presentes en el medio ambiente. Con el fin de contribuir al conocimiento de la diversidad genética de los hongos controladores biológicos de insectos de la zona central cafetera colombiana, mediante técnicas moleculares se estudiaron las poblaciones del hongo *Metarhizium* spp. La evaluación de la diversidad genética se realizó mediante la secuenciación de las regiones espaciadoras transcritas de los genes ribosomales (ITS) y de los exones de la región 3' del gen de la beta-tubulina, y por medio de la amplificación de fragmentos polimórficos en sus sitios de restricción (AFLPs). Se evaluaron 33 aislamientos recolectados en la zona cafetera. Las diferencias entre los organismos se analizaron mediante la construcción de matrices de similitud a partir de 203 marcadores AFLPs, utilizando el índice de Jaccard. Los aislamientos se agruparon mediante el algoritmo UPGMA y el análisis de coordenadas principales PCORDA. Las secuencias de regiones ITS y beta-tubulina de aislamientos representativos de los grupos obtenidos, se compararon con secuencias existentes en GenBank y se analizaron mediante alineamiento múltiple usando CLUSTAL. Se ratificó la existencia de tres grupos intra-específicos para *Metarhizium anisopliae*, que no tienen relación con origen geográfico, tipo de cultivo, ni hospedero. El análisis de DNA ribosomal ubica a todos los aislamientos obtenidos dentro de la subespecie *M. anisopliae anisopliae*, con estado perfecto en Ascomycetes Clavicipetales. *Metarhizium* presentó dos genes de beta-tubulina, que pueden corresponder a dos alelos o a una familia, pero con significancia taxonómica.

**Palabras clave:** Enemigos naturales, bioprospección, café, hongos.

## GENETIC DIVERSITY OF *Metarhizium* spp. OF THE COLOMBIAN COFFEE ZONE

Diversity assessment is a key factor to preserve and exploit the genetic resources of the environment. In order to contribute to the knowledge on genetic diversity of fungi for the biological control of insect pests of the Colombian coffee central zone, the populations of the *Metarhizium* spp. fungus were studied by means of molecular techniques. The assessment of genetic diversity was made by sequencing the transcribed spacer regions of the ribosomal genes (ITS) and the exons of region 3 of the beta-tubulin gene, and by amplifying polymorphic fragments in their restriction sites (AFLPs). Thirty-three isolates collected in the coffee zone were evaluated. Differences between organisms were analyzed by constructing similarity matrices from 203 AFLP markers, using the Jaccard index. The isolates were grouped by the UPGMA algorithm and the PCORDA main coordinate analysis. The sequences of ITSs and beta-tubulin regions of isolates representative of the groups obtained were compared with existing sequences in the GenBank and analyzed by multiple alignment using CLUSTAL. The existence of three intra-specific groups for *Metarhizium anisopliae*, that have no relation with geographical origin, type of crop, or host was confirmed. The analysis of ribosomal DNA locates all the isolations obtained within the subspecies *M. anisopliae anisopliae*, with perfect condition in Clavicipetal Ascomycetes. *Metarhizium* had two beta-tubulin genes, which may correspond to two alleles or one family, but with taxonomic significance.

**Keywords:** Natural enemies, bioprospecting, coffee, fungi.

\*Servicios Profesionales (hasta abril de 2004). Disciplina de Fitopatología, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

\*\*Servicios Profesionales (hasta septiembre de 2009). Disciplina de Entomología, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

\*\*\*Asistente de Investigación (hasta diciembre de 2012). Disciplina de Fitopatología, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

\*\*\*\*Director, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

La riqueza de biodiversidad en poblaciones de hongos, generalmente se refiere al número de géneros y especies que pueden encontrarse en un ambiente determinado; sin embargo, una buena parte de esta riqueza se encuentra escondida dentro de las especies, en las poblaciones (7). Hasta el momento, esta biodiversidad solamente se apreciaba mediante observaciones de invernadero o laboratorio que involucraban pruebas de patogenicidad, reacciones bioquímicas o delicadas apreciaciones microscópicas. Desafortunadamente, estas características fenotípicas se hallan influenciadas por el medio ambiente, además de ser escasas. Por ejemplo, las características de producción de conidias son inestables, ya que dependen de diferentes condiciones de cultivo o aparecen sólo después de varios subcultivos, por lo cual no es un sistema confiable de clasificación taxonómica (9). Por estas razones, la dependencia en las características morfológicas puede llevar a conclusiones erróneas en cuanto a la variabilidad genética de una población.

La estimación de la diversidad es una condición importante para conservar y aprovechar los recursos genéticos presentes en el medio ambiente. Como primera medida, permite la separación de genotipos morfológicamente similares, proveyendo al mismo tiempo un método de identificación de cepas o de detección y rastreo de genotipos particulares en el medio ambiente. De otro lado, la diferenciación de aislamientos dentro de una misma especie ofrece la posibilidad de maximizar el número de candidatos diferentes para ser evaluados en pruebas de control biológico, o de determinar el tamaño representativo de la muestra a recolectar en estudios de campo. Finalmente, la estimación de la variabilidad de una población permite deducir comportamientos reproductivos importantes en la dinámica del organismo en

el campo, importante para trabajos de flujo genético en poblaciones locales, cuando se liberan cepas foráneas (2).

Como alternativa al uso de características fenotípicas, las técnicas moleculares se han presentado como una herramienta valiosa para varias disciplinas, entre ellas, la sistemática. El desarrollo de marcadores moleculares permite estudiar las poblaciones sin influencia del medio ambiente, de forma muy amplia, debido a la gran cantidad de información presente en el DNA, y de una manera muy repetible y objetiva. Dentro de las aplicaciones de los métodos moleculares en la sistemática están la determinación de relaciones entre los grupos de hongos y la aclaración de conceptos sobre las distintas especies. En este último caso, la aplicación de las técnicas de marcadores moleculares ha permitido definir patrones filogenéticos que no concuerdan con las morfologías observadas, así como encontrar nuevas relaciones entre organismos aparentemente distantes (7).

Este trabajo propone hacer una exploración de esa diversidad intraespecífica del controlador biológico *Metarhizium* spp., proveniente de muestreos de campo en la zona cafetera central de Colombia, con el fin de potenciar su aprovechamiento comercial de una manera ecológicamente razonable y proveer herramientas en la protección de la propiedad intelectual de estos organismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de hongos de suelo.** Se utilizaron trampas con larvas de *Galleria mellonella* para recuperar los hongos entomopatógenos, así: se escogieron cinco árboles o sitios de cada uno de dos transectos delimitados en cada lote. Con la ayuda de una pala de jardinería se removió el suelo en el plato de cada árbol o sitio seleccionado

a 12 cm de profundidad y se tomó una muestra de 500 g de suelo, que se depositó en bolsas de plástico negro. Cada muestra de suelo se desmoronó manualmente y se introdujo en un recipiente plástico que contenía diez larvas de último instar de *G. mellonella*. Los recipientes permanecieron a temperatura ambiente durante diez días, luego de los cuales se retiró el suelo de los recipientes para facilitar la búsqueda de las larvas. Aquellas larvas que se recuperaron se clasificaron como vivas, muertas por infección con un entomopatógeno y otros. Las larvas muertas se depositaron en una cámara húmeda para permitir el desarrollo de la infección de los hongos y facilitar la identificación del patógeno. A partir de las larvas que presentaron signos de infección por hongos, se hizo el aislamiento mediante siembra directa, transfiriendo una porción de micelio a una caja de Petri con medio de cultivo SDA. A esta muestra se le adicionaron aislamientos de la Colección de Microorganismos de Cenicafé, obtenidos de Brasil, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda. De estos aislamientos se realizaron cultivos monoespóricos.

**Obtención de DNA.** Se seleccionaron los cultivos monoespóricos de 33 aislamientos de *Metarhizium* provenientes de diferente localidad, cultivo y hospedero, y como “outgroups” un aislamiento de *Lecanicillium* spp. así como de *Beauveria bassiana* (Tabla 1). Para la extracción se utilizó la metodología descrita por Jurgüen (6) con algunas modificaciones: a partir de cada cultivo monoespórico se preparó una suspensión de concentración  $1 \times 10^8$  esporas/mL. Se tomó 1 mL de dicha suspensión y se inoculó en 100 mL de SDB (Sabouraud líquido) y se incubó a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  con agitación de 110 rpm, durante tres días. El micelio obtenido se filtró al vacío usando papel de filtro (Whatman N°1) esterilizado y se

lavó tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, con una espátula esterilizada, se removió el micelio del papel de filtro y se ubicó sobre toallas de papel esterilizadas, para luego retirarles completamente el agua por medio de presión. Una vez seco el micelio, éste se depositó en un mortero de porcelana y se maceró con nitrógeno líquido hasta pulverizarlo.

Este micelio se depositó en tubos Corning de 15 mL, con 5 mL de búfer de extracción (Tris HCl 100mM, ácido etilén diaminotetraacético (EDTA) 10 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%), se homogenizó en vórtex y se incubó en baño de María a  $65^\circ\text{C}$ , durante una hora. Luego, los tubos se centrifugaron a 9.000 r.p.m., durante diez minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó, se le adicionó  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de RNAsa y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora. Posteriormente, se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló suavemente, durante diez minutos. Luego se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante diez minutos. Se realizó otra limpieza del sobrenadante recuperado, adicionando un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló suavemente durante diez minutos y se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante diez minutos.

Al sobrenadante recuperado se le adicionaron 2,5 volúmenes de acetato de sodio 0,3 M preparado en etanol al 70% y se agitó por inversión hasta observar la formación del precipitado de ADN. El sobrenadante se eliminó luego de centrifugar a 9.000 r.p.m., durante 15 minutos. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 75%, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de búfer EB (Tris-HCl 10mM) pH 8,0. La concentración de ADN se determinó utilizando un fluorómetro TBS 380 Turner Biosystems INC.

**Obtención de AFLPs.** Para la obtención de los AFLPs se siguió el protocolo descrito por el “AFLP Microorganism Primer Kit” (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), con algunas modificaciones. La concentración de ADN de todas las cepas se estandarizó en 10 ng.uL<sup>-1</sup>, utilizando 180 ng de cada cepa en total, para la digestión durante tres horas con las enzimas de restricción EcoR 1 y Mse 1, teniendo como volumen final 25 uL. En la reacción de ligación de los adaptadores, se agregaron 24 uL de solución con los adaptadores y 1 uL de ligasa a cada muestra digerida. Luego de tres horas de incubar a 20°C no se realizó la dilución 1:10 recomendada por el kit. Para la preamplificación se realizó una reacción de PCR, con un volumen final de 25 uL, agregando 3 uL de la reacción previa de digestión y ligación. El programa de PCR se corrió en un termociclador (PTC-200 MJ Research Inc.) con una denaturación inicial de 94°C, durante dos minutos, una denaturación de 94°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 60 segundos, extensión de 72°C por 30 segundos, 20 ciclos en total. El producto de la reacción se diluyó (1:50) en búfer TE y se almacenó a -20°C.

En la amplificación selectiva se utilizaron las combinaciones de *primers* M-G y E-AT. La reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25 uL. El programa de PCR se corrió en un termociclador (PTC-100 MJ Research.Inc) con una denaturación inicial de 94°C, durante dos minutos, una denaturación de 94°C por 20 segundos, alineamiento a 66°C por 30 segundos, extensión de 72°C por 25 segundos, bajando 1°C la temperatura de alineamiento por ciclo hasta llegar a 56°C, temperatura a la cual se realizaron 31 ciclos más en total. Los productos se separaron en un gel de acril/bisacrilamida 4% a 2.500 V y 110 Ma, durante una hora y media, utilizando 5 uL de la reacción de preamplificación. La fijación se llevó a cabo con ácido acético glacial al 10% y después el gel fue teñido con plata, durante 40 minutos. Luego de revelarlo con solución de revelado (60 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> al 37%, 10 mg.mL<sup>-1</sup> de tiosulfato de sodio, 2.000 mL de H<sub>2</sub>O), se detuvo la reacción con ácido acético glacial en etanol absoluto, se dejó secar el gel durante 12 horas a temperatura ambiente y se tomó una foto digital.

**Tabla 1.** Características de los aislamientos de *Metarhizium* spp. Ma: Aislamientos obtenidos de insectos; PSMa: Aislamientos provenientes de suelo usando trampas de *Galleria mellonella*.

Código	Cepa	Procedencia	Hospedero	
			Orden	Familia
M1	Ma 9902	Colombia (Villamaría - Caldas)	Hemiptera	Miridae
M2	Ma 9303	Colombia (Amalfi - Antioquia)	Coleoptera	Scolytidae
M3	Ma 9209	Colombia (Caquetá)	-	-
M4	Ma 0002	Colombia (Chinchiná - Caldas)	Hymenoptera	Formicidae
M7	PSMa 03150	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M8	PSMa 03119	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M9	PSMa 03123	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae

Continúa...

...continuación.

Código	Cepa	Procedencia	Hospedero	
			Orden	Familia
M10	PSMa 03129	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M11	PSMa 0302	Colombia (Naranjal - Caldas)	Lepidoptera	Pyrallidae
M12	PSMa 0314	Colombia (Naranjal - Caldas)	Lepidoptera	Pyrallidae
M13	PSMa 0331	Colombia (Naranjal - Caldas)	Lepidoptera	Pyrallidae
M15	Ma 9212	Nueva Zelanda	Coleoptera	Scarabaeidae
M16	Ma 9205	Estados Unidos	Coleoptera	Curculionidae
M17	Ma 9222	Australia	Coleoptera	Scarabaeidae
M18	PSMa 03133	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M19	PSMa 03107	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M20	PSMa 03144	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M21	Ma 9901	Colombia (Armero - Tolima)	Coleoptera	Curculionidae
M22	Ma 9903	Colombia (Villamaría - Caldas)	Coleoptera	Curculionidae
M23	Ma 9905	-	Coleoptera	Curculionidae
M24	Ma 9904	Colombia (Chinchiná - Caldas)	Coleoptera	Melalonthidae
M25	Ma 0004	Colombia (Chinchiná - Caldas)	Coleoptera	Melalonthidae
M26	Ma 0006	Colombia (Santa Rosa de Cabal - Risaralda)	Coleoptera	Curculionidae
M27	Ma 0101	Colombia (Chinchiná - Caldas)	Hymenoptera	Formicidae
M28	Ma 0102	-	Lepidoptera	Papilionidae
M29	Ma 9229	Brasil	Homoptera	Cercopidae
M32	Ma 9217	Nueva Zelanda	Coleoptera	Scarabaeidae
M33	Ma 9201	Estados Unidos	Coleoptera	Curculionidae
M34	Ma 0301	Colombia (Antioquia)	Coleoptera	-
M35	PSMa 03148	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M36	PSMa 03138	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M37	PSMa 03142	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Lepidoptera	Pyrallidae
M38	Ma 0302	Colombia (Chinchiná - Caldas)	Coleoptera	Curculionidae
	Bb 9119	Colombia (Risaralda)	Coleoptera	Scolytidae
	<i>Lecanicillium</i> sp.	Colombia (El Rosario - Antioquia)	Homoptera	Coccidae

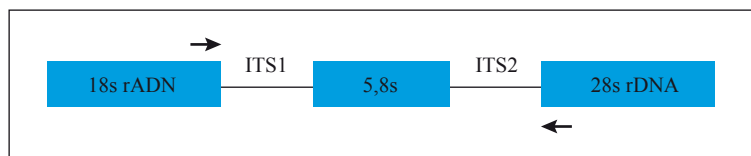
Para analizar los marcadores obtenidos, se utilizó el programa ImageMaster™ 1D Image Analysis Software y se elaboró una matriz binaria, donde la codificación de las bandas se representó con el número uno para la presencia y cero para la ausencia. A partir de la matriz binaria obtenida y con la ayuda de la herramienta de software INFOSAT, se realizó el agrupamiento de los aislamientos mediante análisis de conglomerados, construyendo una matriz de similitud con el coeficiente de Jaccard (S), distancias genéticas (D) determinadas como  $D=(1-\text{Raíz cuadrada de } (1-S))$ , y el algoritmo UPGMA. Igualmente se realizó el análisis no jerárquico de coordenadas principales (PCOORDA).

**Amplificación de ITS (*Internal Transcribed Spacers*).** Con el fin de evaluar la diversidad genética de los aislamientos de *Metarhizium* spp. de la zona cafetera central colombiana, y basados en el hecho de que algunas secuencias en el ADN ribosomal han sido ampliamente utilizadas en los estudios taxonómicos (4), se abordó la estrategia de la amplificación mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de las secuencias presentes entre los genes ribosomales, conocidas como Secuencias Internas Transcritas o ITS, las cuales constituyen una fuente importante de variabilidad. Dado que los ITSs no codifican para algún gen, las mutaciones que allí ocurren no afectan el desarrollo del organismo y, por lo tanto, se acumulan. De esta manera, los ITSs pueden presentar importantes variaciones en tamaño y en secuencia, con fines de caracterización.

La amplificación de las secuencias espaciadoras internas (ITS) del ADN ribosomal (Figura 1) se realizó utilizando los iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), los cuales permiten la amplificación de un fragmento de rADN que incluye las regiones ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5.8S (1, 8).

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos eppendorf de 0,5 mL, en un volumen final de 50 µL con los siguientes componentes: 0,2 µM de cada iniciador, búfer PCR 1X (20 mM TrisHCl Ph 8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada uno de los deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,25 U de Taq polimerasa y 50 ng de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research Inc PTC-200, utilizando las siguientes condiciones: una denaturación inicial de 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1,5 minutos, alineamiento a 55°C por un minuto, extensión de 72°C por dos minutos. Por último, se realizó una extensión final a 72°C por cinco minutos.

El resultado de la amplificación fue evaluado tomando 8 µL de cada reacción y realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%, 80V durante dos horas en búfer TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM y EDTA 1 mM; pH 8,0). Los productos amplificados se detectaron adicionando al gel 1 µL de una solución de bromuro de etidio de 10 mg.mL<sup>-1</sup> y el tamaño de cada fragmento se determinó mediante el empleo del software *Image Master VDS* Versión 3.0 por comparación



**Figura 1.** Esquema representativo de los genes del ADN ribosomal y los ITSs amplificados por PCR.

con el marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

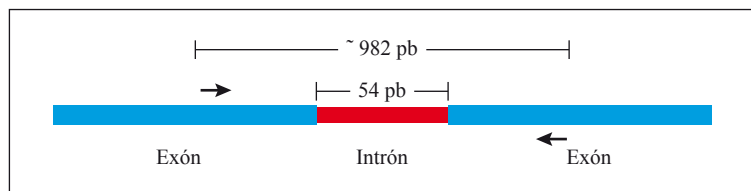
**Amplificación del gen de  $\beta$ -Tubulina.** Un intrón y parte de dos exones del gen de la  $\beta$ -tubulina (Figura 2) se amplificaron usando los iniciadores: Bt-T2m-Up (5' CAACTGGGCTAAGGG TCATT-3') y Bt-LEV-Lo1 (5'-GTGAACTCCATCTCGTCCATA-3') (5). Para las reacciones de PCR se utilizaron las condiciones mencionadas anteriormente, para la amplificación de los ITS.

**Clonación y secuenciación.** Los fragmentos obtenidos se clonaron siguiendo la metodología descrita en el manual del *Kit pGEM T-easy Vector System II* (Promega, Madison, WI), haciendo transformaciones de células competentes (JM 109). Se utilizó una concentración de 50 uL de las células competentes y 5 ng.mL<sup>-1</sup> de DNA de cada muestra, con una relación inserto:vector de 3:1. Para seleccionar células transformadas, se sembraron alícuotas de 100 uL en cajas con LB más ampicilina al 1%, con 100 uL de IPTG y 20 uL de X-gal. Éstas se incubaron a 37°C por 12-16 horas. Finalmente, mediante un *Colony* PCR, se determinó el tamaño del inserto. Los plásmidos que contenían los fragmentos se purificaron mediante el protocolo descrito por el *Kit Miniprep* de QIAGEN y se enviaron a secuenciar a la compañía Macrogen, Corea del Sur. Mediante protocolos diseñados en el Laboratorio de Bioinformática de Cenicafé, se procesaron los datos de secuenciación y se analizaron las secuencias limpias obtenidas.

## RESULTADOS

**Marcadores AFLPs.** Las reacciones de AFLP produjeron 230 marcadores repetibles, que generaron una huella digital (*Fingerprint*) única para cada aislamiento. El coeficiente de correlación cofenética, que indica la correlación de las distancias definidas por la métrica de árbol binario con las distancias originales entre aislamientos, indicó un valor usando la distancia genética basada en el índice de Similitud de Jaccard, con UPGMA de 0,68. En el dendrograma resultante se aprecia la conformación de tres grupos, separados por distancias genéticas superiores a 0,5 y claramente diferenciables de las especies escogidas como “*outgroup*”, *Lecanicillium* y *Beauveria* (Figura 3).

El análisis de coordenadas principales muestra una composición de vectores que tienen un efecto individual mínimo, en la explicación de la variabilidad observada, lo que sugiere que no hay marcadores AFLPs que definan la separación de los grupos. El árbol de recorrido mínimo refleja nuevamente la agrupación obtenida en el análisis de conglomerados (Figura 4). Aislamientos de la Colección de Microorganismos de Cenicafé obtenidos de Brasil, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda se agrupan con los aislamientos colombianos en dos de los grupos. No se aprecia una asociación entre los grupos y su origen geográfico u hospedero.



**Figura 2.** Esquema representativo de los dos exones del gen de  $\beta$ -tubulina y el intrón amplificados por PCR.

## Análisis de secuencias de ITS y beta-tubulina

La comparación con otros hongos Ascomycetes en el análisis CLUSTAL de las secuencias de DNA ribosomal de los aislamientos de la zona cafetera central (Figura 5) indica la ubicación dentro de la especie *M. anisopliae*, y los agrupa en la subespecie *M. anisopliae anisopliae*, una de las varias subespecies reportadas en la literatura, y cercana a *M. anisopliae majus* y *M. anisopliae lepidiatum*. El estudio de la región 3' del gen de la beta-tubulina revela la existencia de dos alelos o dos copias independientes en el genoma de *Metarhizium*. Una de las secuencias ( $\beta$ tub-1) apareció con más frecuencia, a pesar de ser la menos encontrada en otros hongos. Para algunos aislamientos se identificaron las dos versiones del gen. El análisis de agrupamiento muestra la separación entre especies utilizando esta región (Figura 6).

## DISCUSIÓN

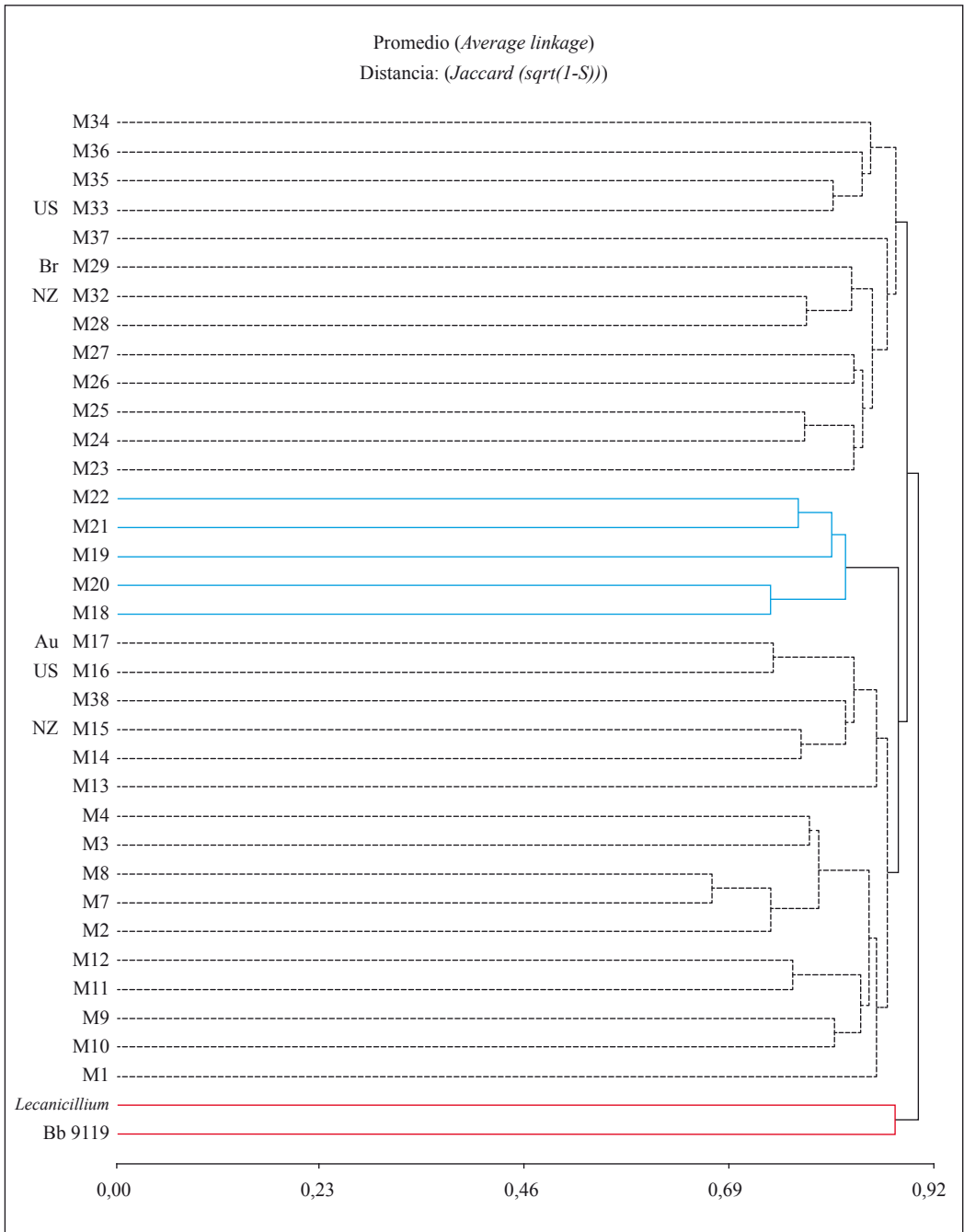
Con el propósito de caracterizar las poblaciones de *Metarhizium* spp. asociadas a suelos y cultivos de la zona cafetera, se completó el análisis molecular basado en marcadores presentes en todo el genoma, así como en variaciones de regiones puntuales con significado taxonómico. Se encontró que la única especie presente en los muestreos fue *M. anisopliae* subespecie *anisopliae*, como lo indica el análisis de DNA ribosomal. No se evidencia por estas secuencias o las de beta-tubulina una especiación en proceso.

La variabilidad nula en cuanto a especies, presenta como contraste una alta variabilidad intraespecífica con tres poblaciones claramente diferenciadas. El estado perfecto asociado a *Metarhizium* es *Cordyceps* sp., en el cual también están ubicados los estados perfectos de otros hongos como *Beauveria*.

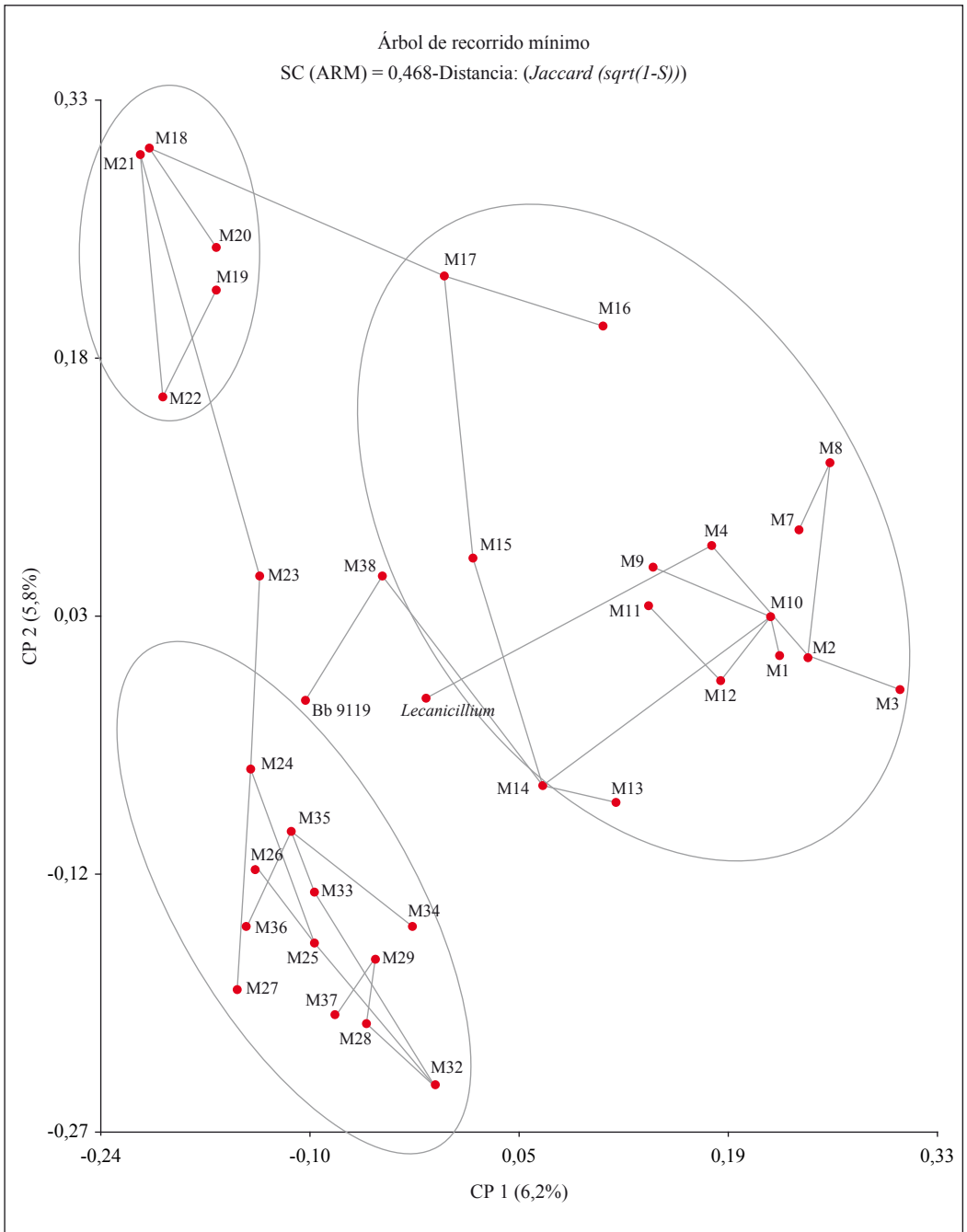
Taxonómicamente éstos se describen como pertenecientes a Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreales, Hypocreales, Clavicipitaceae, *Cordyceps*. Sin embargo, las distancias genéticas tan altas, tanto entre grupos como entre individuos de los grupos, sugerirían un bajo intercambio de material genético vía recombinación sexual y predominancia de reproducción clonal. A pesar de esto, no se encontraron aislamientos con distancias inferiores a 0,6 (en escala de 0 a 1). Las tres poblaciones comparten nichos ecológicos al encontrarse conviviendo en las mismas zonas. El hecho de observarse similitud genética con aislamientos de sitios distantes como Australia, Estados Unidos y Brasil, puede indicar una constitución poblacional similar en estos lugares y una dispersión mundial de los genotipos de *Metarhizium*. Esta distribución disminuye el efecto de introducciones de cepas (formulaciones biológicas) foráneas en la zona cafetera. De igual manera, la baja recombinación puede ser positiva en la evaluación de riesgos de cepas transgénicas, debido a la tasa reducida de movimiento de los genes modificados/introducidos entre individuos.

De otro lado, la alta variabilidad puede ser una fuente interesante para la formulación de productos que tomen ventaja de las mezclas intraespecíficas, para incrementar poblaciones en cultivos donde se utilice el control biológico en la zona cafetera. Como se ha observado en *Beauveria* (3), el diseño de estas mezclas combinado con información de virulencia del biocontrolador, puede incrementar de manera significativa la eficiencia (mortalidad y tiempo de muerte) en el caso de entomopatógenos. La adaptabilidad y ubicuidad de *Metarhizium* en la zona cafetera lo hacen un microorganismo idóneo como alternativa en el manejo de plagas, tanto de café como de sus cultivos asociados.

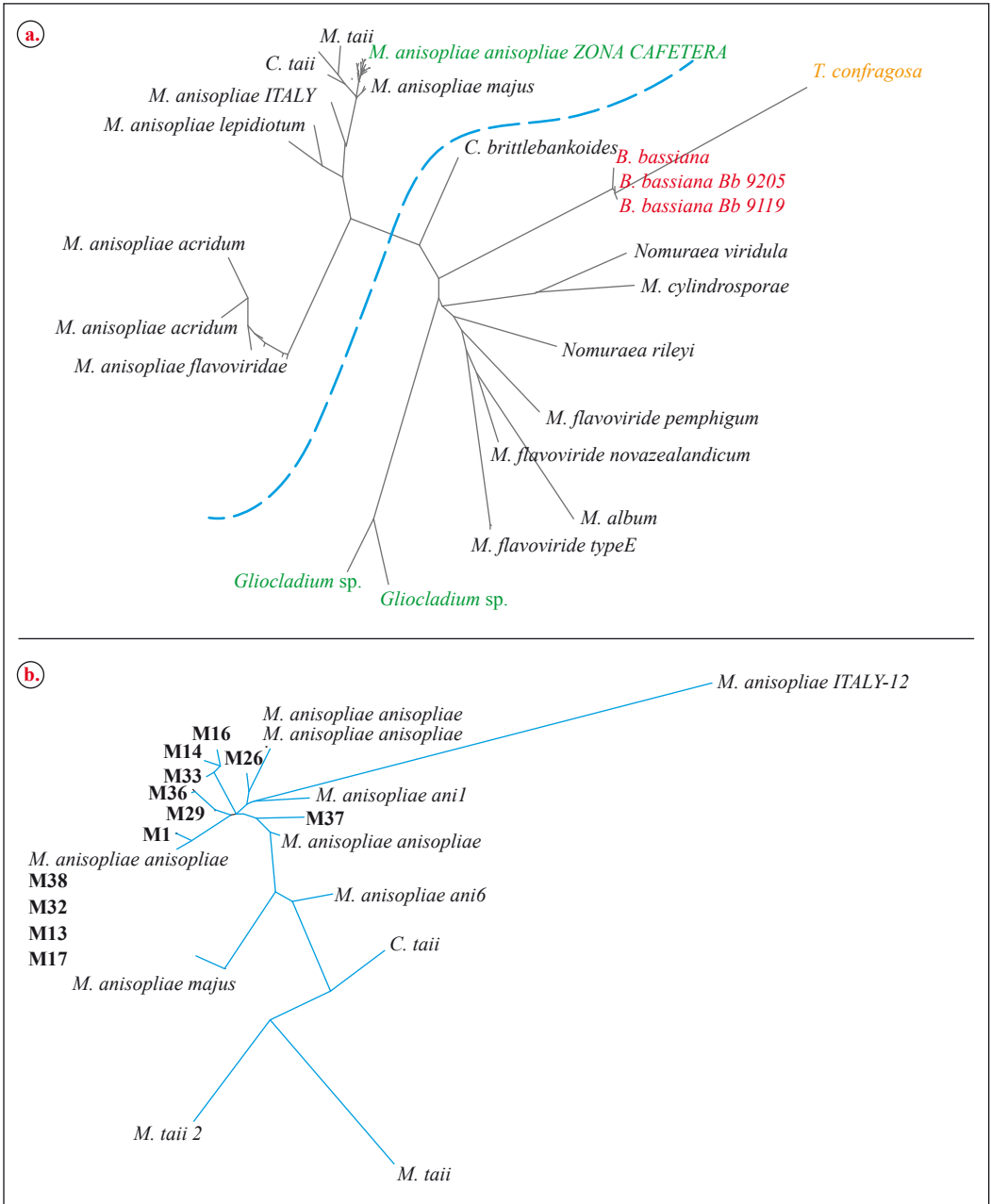




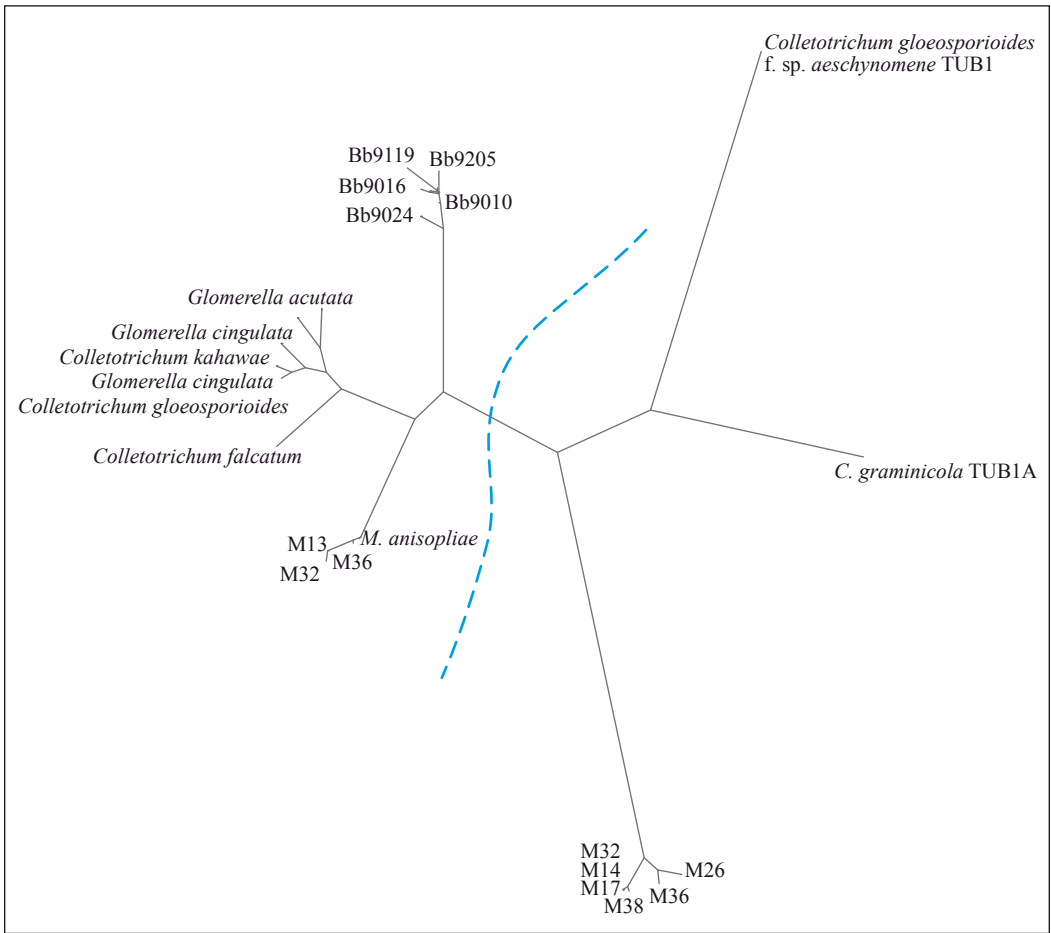
**Figura 3.** Dendrograma derivado del análisis UPGMA de los marcadores AFLP obtenidos para aislamientos de *Metarhizium* spp. de la zona cafetera. El eje X corresponde a las distancias genéticas. NZ=Nueva Zelandia; Au=Australia; US=Estados Unidos; Br=Brasil.



**Figura 4.** Análisis de Coordenadas Principales con Árbol de recorrido mínimo para los aislamientos de *Metarhizium* spp. obtenidos en la zona cafetera y analizados mediante marcadores AFLPs. Los círculos representan los grupos obtenidos mediante el análisis de Conglomerados.



**Figura 5. a.** Dendrograma sin raíz basado en las secuencias de DNA ribosomal de los aislamientos de *Metarhizium* de la zona cafetera, con especies de los géneros *Metarhizium*, *Gliocladium*, *Beauveria*, *Cordyceps* y *Torriubiella*. La línea punteada sugiere la separación entre la especie *M. anisopliae* y otras especies del género u otros géneros; **b.** Dendrograma a nivel de subespecie *M. anisopliae anisopliae* con los aislamientos de la zona cafetera marcados en negrilla.



**Figura 6.** Dendrograma sin raíz basado en las secuencias de beta-tubulina de los aislamientos de *Metarhizium* de la zona cafetera, con especies de los géneros *Metarhizium*, *Beauveria* (Bb) y *Glomerella* (estado perfecto de *Colletotrichum*). La línea punteada sugiere la separación entre los dos tipo de Beta-tubulina.

## AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se realizó gracias al apoyo financiero del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo territorial de Colombia por medio del Convenio Especial de Cooperación Científica y Tecnológica No. 021 de 2002, y de la Federación Nacional de Cafeteros a través del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

## LITERATURA CITADA

1. CHILLALI, M.; IDDER, H.; GULAUMIN, J.; MOHAMMED, C.; ESCARMANT, L.; BOTTON, B. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycological research* 102(5):533-540. 1998.
2. CROLL, D.; MCDONALD, B. The genetic basis of local adaptation for pathogenic fungi in agricultural ecosystems. *Molecular ecology* 26(7):2027-2040. 2017.

3. CRUZ, L.P.; GAITÁN B., A.L.; GÓNGORA B., C.E. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Applied microbiology and biotechnology* 71(6):918-26. 2005.
4. HILLIS, D.; DIXON, M. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly review of biology* 66(4):411-453. 1991.
5. JONG, S. DE J.; LÉVESQUE, C.A.; VERKLEY, G.; ABELN, C.A.; RAHE, J.E.; BRAUN, G. Phylogenetic relationships among *Neofabrea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the  $\beta$ -tubulin gene. *Mycological research* 106(6):658-669. 2000.
6. J JURGÜEN, W.; LENGELER, K.B.; KOTHE, E. An instant preparation method for nucleic acids of filamentous fungi: Molecular genetics. [En línea]. Marburg : Philipps university, 2001. Disponible en internet: <http://www.fgsc.net/fgn43/wendlan.html>.
7. TAYLOR, J.W.; BRANCO, S.; GAO, C.; HANN S., C.; MONTOYA, L.; SYLVAIN, I.; GLADIEUX, P. Sources of fungal genetic variation and associating it with phenotypic diversity. *Microbiology spectrum* 5(5):FUNK-0057-2016. 2017.
8. WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. p. 315-322. En: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego : Academic press, 1990. 482 p.
9. ZANETTE, G.; NÓBREGA, G.; MEIRELLES, L. Morphogenetic characterization of *Colletotrichum sublineolum* strains, causal agent of anthracnose of sorghum. *Tropical plant pathology* 34(3):146-151. 2009.