



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.

Marily González Castillo¹, Raúl Rodríguez Herrera¹, Ismael Amaya Rivera².

Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25282¹. GreenCorp Biorganiks de México, S.A. de C.V. Saltillo, Coahuila, México²
E-mail: marily7@hotmail.com

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, suelos cultivados, PCR.

Introducción. En la presente investigación se realizó la identificación morfológica y molecular de cepas de hongos caracterizados como entomopatógenos y de otros que fueron aislados de suelos cultivados a través de la infección del insecto *tenebrio molitor*. La identificación morfológica se llevó a cabo por observación microscópica y macroscópica. Para la identificación molecular, se recurrió a la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para posteriormente detectar variaciones en las secuencias nucleotídicas de los productos amplificados y poder diferenciar el género y la especie de los hongos analizados.

Metodología. El aislamiento de los hongos presentes en suelos agrícolas se realizó a través de la contaminación inducida de insectos, principalmente usando larvas de *tenebrio molitor*. Los hongos aislados fueron cultivados en placas de PDA, incubadas a 25°C por un periodo de 7 días (1). Después se realizó la caracterización morfológica por observación macroscópica (2) y microscópica realizando tinciones con azul de algodón (3). Los hongos se propagaron en caldo de papa en un periodo de incubación de 5 días a 25°C en agitación continua (1). Para obtener el ADN fúngico se utilizó la técnica de extracción de CTAB (4). Posteriormente se recurrió a la técnica de PCR amplificando el gen que codifica para la región ribosomal 18s (rDNA), utilizando los iniciadores PN3 (5'-CCG TTG GTG AAC CAG CGG AGG GAT C-3') y PN10 (5'-TTC GCT TAT TGA TAT GCT TAA G-3'). La reacción se llevó a cabo en 35 ciclos utilizando una temperatura de alineación de 54°C (4). Finalmente se obtuvieron las secuencias de cada muestra amplificada a través de un proceso basado en la reacción de PCR asimétrico (BIG Dye); estas secuencias fueron depuradas y analizadas en la base de datos del NCBI para su identificación.

Resultados.



Fig1.- Productos de extracción de ADN.- 1. Ma: *Metarhizium anisopliae* 2. Vl: *Verticillium lecanii*, 3. Pl: *Paecilomyces lilacinus* 4. Bb: *Beauveria bassiana* 5. Nr: *Nomurea rileyi* 6. Pf: *Paecilomyces fumosoroseus*.

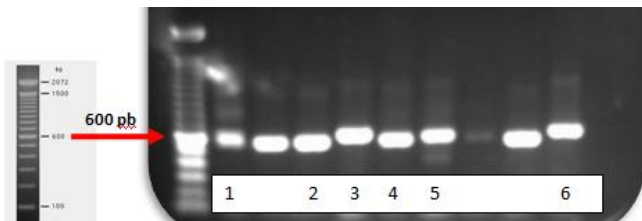


Fig. 2.- Productos de la amplificación de ADN.- 1.- Ma: *Metarhizium anisopliae* 2.- Bb: *Beauveria bassiana*, 3.- Pf: *Paecilomyces fumosoroseus*, 4.- Vl: *Verticillium lecanii* 5.- Pl: *Paecilomyces lilacinus*, 6.- Nr: *Nomurea rileyi*

Tabla1. Características morfológicas de los hongos utilizados

Hongo	Características
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Consistencia algodonosa, color café cremoso, crecimiento expandido.
<i>Verticillium lecanii</i>	Consistencia algodonosa, color blanco, crecimiento expandido y plano.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Consistencia polvosa, color verde, crecimiento expandido.
<i>Nomurea rileyi</i>	Consistencia firme, color blanco y verde en la periferia, crecimiento longitudinal.
<i>Beauveria bassiana</i>	Consistencia algodonosa polvosa, color blanco cremoso, crecimiento expandido.
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Consistencia algodonosa, color liliáceo, crecimiento expandido.

Conclusiones: Es posible el aislamiento de hongos entomopatógenos de suelos cultivados así como su reproducción en medios convencionales. Su caracterización morfológica macroscópica concuerda con la identificación molecular a la que fueron sometidos al presentar una identidad de casi un 100% con los hongos registrados en la base de datos del NCBI.

Bibliografía.

- 1.- Javier Giraldo. Uso de hongos entomopatógenos en el control de ectoparásitos. Julio 2009.
- 2.- Arnulfo Monzón. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63, p. 95 -103, 2001.
- 3.- Cañedo V., Ames T. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. 62 pp. Octubre 2004.
- 4.- Raúl Rodríguez Herrera. Manual de Biología Molecular. pp, 7,12, 15-19. 2009.
- 5.- Fabián Echeverría Beirute. "Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Enero 2006.