

## REGULACIÓN DE LA POBLACIÓN DE INSECTOS POR ASOCIACIONES FÚNGICAS EN LA COMUNIDAD EL “OCOTERO” XICHÚ, PARTE DE LA SIERRA GORDA DE GUANAJUATO

Alejandro Zúñiga-Zúñiga, V. Hernández-Hernández, Gustavo A. De la Riva-De la Riva, Francisco Alejo-Iturbide y Juan Gualberto Colli-Mull✉

Instituto Tecnológico superior de Irapuato. Carretera Irapuato Silao km. 12, 5 col. El copal, C. P. 36821, Irapuato Guanajuato México.

✉Autor de correspondencia: jcolli@itesi.edu.mx

**RESUMEN.** Los insectos representan el grupo de animales más abundante y biodiverso del planeta con cerca de 1,000 000 especies descritas. Juegan papeles importantes en el mantenimiento de los ecosistemas, regulando sus poblaciones, como polinizadores y descomponedores, así como una amplia gama de potenciales aplicaciones. Las poblaciones de insectos son reguladas por interacciones ecológicas como la depredación, simbiosis, mutualismo, comensalismo y parasitismo. En particular el parasitismo es regulado por un grupo de bacterias y hongos conocidos como entomopatógenos. Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos con alta capacidad de esporulación e infección, entre los géneros más representativos se encuentran; *Beauveria*, *Verticillium*, *Metarrizium* y *Cordyceps*. Se colectaron 264 insectos infectados durante la primavera y verano del 2014, de los cuales se logró aislar 85 hongos distintos. El orden coleóptera fue uno de los órdenes mayormente infectados seguido de blatodea y hemíptera. Los análisis tipo RFLP de la región intergénica ITS, arrojaron 48 grupos de hongos relacionados filogenéticamente, lo que representa una gran diversidad de hongos asociados a la regulación de las poblaciones de insectos en un ecosistema natural.

**Palabras clave:** Entomopatógenos, biodiversidad, ITS, regulación, RFLP.

### Populations control of insects by fungal associations, in the community “El Ocotero” part of the Sierra Gorda de Guanajuato

**ABSTRACT.** Insects have the most abundant and biodiversity group of animals on the planet with 1,000 000 described species. Insects play important roles in maintaining ecosystems, regulating their populations, as pollinators and decomposers, and a wide range of potential applications. Insect populations are regulated by ecological interactions like predation, symbiosis, mutualism, commensalism and parasitism. In particular parasitism is regulated by a group of bacteria and fungi known as entomopathogenic. There are over 700 species of entomopathogenic fungi with high capacity for sporulation and infection, among the most representative genus are; *Beauveria*, *Verticillium*, *Metarrhizium* and *Cordyceps*. We collected 264 infected insects during the spring and summer of 2014; it was possible to isolate 85 different fungi. The Coleoptera order was one of the orders mostly infected followed by blattodea and Hemiptera. RFLP analysis of the intragenic region ITS, showed 48 phylogenetic related groups of fungi, representing a wide variety of fungi associated with the regulation of insect populations in a natural ecosystem.

**Keywords:** Entomopathogens, biodiversity, ITS, regulation, RFLP.

### INTRODUCCIÓN

Los insectos, son el grupo de animales más abundante y diverso que han colonizado la tierra, invadiendo prácticamente todos los ambientes terrestres y acuáticos existentes. Recientemente, se ha ponderado las ventajas de utilizar los insectos en estudios de biodiversidad debido a su abundancia, ecología, y facilidad de captura (Brown, 1982; Borror *et al.*, 1989, 1991; Pearson y Cassola, 1992; Martín, 1997).

Aún se desconoce el número real de especies de insectos que puedan existir y entre los entomólogos se estima que sean aproximadamente de 5,000,000 a 20,000,000 de especies,

actualmente hay alrededor de 1,000 000 de especies descritas; esta cifra es controversial y todavía no existe un acuerdo de cuál puede ser el número aproximado que refleje la verdadera riqueza del grupo. Los insectos se consideran un grupo importante para la evaluación de los cambios producidos por la actividad del hombre en ecosistemas naturales, así como para el monitoreo de la conservación de la biodiversidad en bosques (Halffter y Ros, 1998), ya que desempeñan diversos papeles en el ecosistema como polinizadores y descomponedores, así como a una amplia gama de potenciales aplicaciones.

Recientemente se determinó la diversidad de familias de Coleópteros en la Sierra Gorda de Guanajuato, sugiriendo que el bosque de Pino-Encino tiene una mayor diversidad comparado con un bosque de Cedro, entre las familias de insectos más abundantes se encontró Curculionidae, Nitidulidae y Carabidae (Colli *et al.*, 2015).

Las poblaciones naturales de insectos son mantenidas en equilibrio por interacciones biológicas, como la depredación, competencia, simbiosis, mutualismo, comensalismo y parasitismo. El parasitismo, es regulado principalmente por grupos de microorganismos conocidos como entomopatógenos, los cuales pueden ser tanto bacterias como hongos.

Los hongos entomopatógenos se definen como, parásitos obligados o facultativos de insectos, con una alta capacidad de esporulación, sobrevivencia y capacidad de penetración directa a través del tegumento (Allendes, 2007). Dentro del grupo de los insectos, infectan en su gran mayoría a los órdenes Hemíptera, Díptera, Coleóptera, Lepidóptera, Himenóptera y Ortóptera (Tanada y Kaya, 1993).

Existen más de 100 géneros con 700 especies de hongos asociados a insectos (Alatorre, 2007). Entre las especies más representativas de hongos entomopatógenos se encuentran: *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, Sorokin, 1883), *Beauveria bassiana* (Agostino bassi, 1853), *Verticillium lecanii* (Nees, 1948), y *Cordyceps militaris* (Linneo, 1833; Torres *et al.*, 2012).

El objetivo del presente trabajo fue estimar la abundancia de insectos infectados en primavera y verano del 2014, la especificidad de infección, así como la diversidad de los hongos asociados a los insectos por marcadores tipo RFLP en la comunidad de El Ocotero Xichú, una porción de la Reserva de la Biósfera Sierra Gorda de Guanajuato.

## MATERIALES Y MÉTODO

El área de trabajo fue el Área Natural Protegida (ANP), Charco Azul, en el municipio de Xichú, parte de la Sierra Gorda de Guanajuato 21° 18' 51.9'' N y 100° 06' 38.2'' O. Se realizó la colecta de organismos en primavera (Marzo-Junio) y verano (Julio-October) del año 2014. Los insectos colectados fueron seleccionados por presentar los siguientes síntomas de patogenicidad; que estuvieran cubiertos de micelio o inmóviles (Hernández. *et al.*, 2008). Se colectaron organismos en la hojarasca, bajo rocas y sobre plantas en Bosque de *Quercus* sp., y Bosque de *Cupressus* sp. Los insectos infectados, fueron identificados por caracteres morfológicos de los órdenes según Morón *et al.*, 1997; Gillot, 2005; Arnett Ross y Jacques, 1981.

Los hongos asociados a los insectos, se aislaron por siembra directa, tomando una parte del insecto infectado y colocándolo directamente en placas de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y Souburad (SDA) con estreptomycin (5mg/ml). Posteriormente las cajas fueron incubadas en la cámara de crecimiento a 28° C por 72 h o hasta observar crecimiento miceliar. Los hongos fueron aislados de las placas de cultivo y fueron inoculados por separado en nuevas placas de cultivo hasta obtener cultivos puros.

Además, se realizaron diagramas de rango-abundancia (Favila y Halffter, 1997) por sitio para los órdenes de escarabajos infectados.

Para obtener el DNA genómico total, se utilizó el protocolo de Skroch y Nienhuis 1995, con algunas modificaciones, 100 mg de micelio fue homogenizado y macerado en un amortiguador de lisis (NaCl 0.7M; Tris 0.1M pH 7.5; EDTA 0.01M pH 8; BME 1 % y CTAB 1 %), se incubó a 65°C y se centrifugó a 10,000 rpm. El sobrenadante fue tratado con K CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> 3M pH. 5.2 y con una solución de fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1. El DNA fue precipitado con dos volúmenes de ETOH absoluto y resuspendido en H<sub>2</sub>O grado miliQ.

La región ITS del gen ribosomal 5S se amplificó mediante los iniciadores universales ITS1 e ITS4, (ITS1, 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3': ITS4, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las reacciones se realizaron en tubos de 0.2 ml con un volumen total de reacción de 25 µl con una Super Mix DreamTaq (Thermo Scientific®) en un termociclador BIORAD® con el siguiente programa: desnaturalización de 3m a 95 °C; 50s a 95 °C; 1m a 53 °C; 90s a 72 °C y un ciclo final de 5m a 72 °C. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1% y visualizados en un transluminador UV.

Los productos de PCR de la región ITS, fueron digeridos con las endonucleasas *HinfI* y *AluI* a 37 °C por 2 h. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 2 % y visualizados en un transluminador UV. Los grupos relacionados filogenéticamente, se realizaron con base al número y tamaño de los fragmentos obtenidos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron 264 insectos infectados durante los meses de marzo-junio (primavera) y julio-octubre (verano) de 2014. Los órdenes más abundantes que presentaban signos de infección fueron: Coleóptera, Blatodea y Hemíptera con 90, 15 y 10 organismos respectivamente. Los meses con mayor número de insectos infectados fueron a finales de la primavera y todo el verano (junio, julio, agosto y septiembre) con 44, 22, 30 y 29 organismos colectados (Cuadro 1.) Los órdenes menos infectados fueron Formícida y Ortóptera, También se registraron otros artrópodos infectados como miriápodos y arañas, muchos ejemplares no fueron identificados por el grado de infección que presentaban (Cuadro 1). Como se observa en el cuadro 1, los coleópteros fueron el orden con mayor número de organismos infectados, lo que corresponde con lo reportado por Colli *et al.*, 2015, en donde en un estudio, se registraron 734 organismos que se agrupan en 14 Familias de Coleópteros, siendo el grupo más diverso y abundante de la zona.

Por otra parte, la capacidad de infección de los hongos está fuertemente relacionada con factores ambientales como la temperatura, humedad, velocidad del viento y estructura de la vegetación (Alatorre, 2007), lo que permite inferir la alta incidencia de infección en el verano.

Cuadro 1. Abundancia de insectos infectados en primavera y verano. Ni, no identificado.

Mes	Ni	Himenóptera	Coleóptera	Ortóptera	Miriópoda	Blátida	Hemíptera	Díptera	Formícida	Aránea	Total
Marzo	14	1	3	1	1	1	0	0	0	0	21
Abril	10	0	2	0	1	2	1	1	0	0	17
Mayo	5	4	7	0	1	4	0	2	1	1	25
Junio	19	1	14	0	2	2	3	3	0	0	44
Julio	21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	22
Agosto	15	12	9	0	0	2	2	1	0	0	30
Septiembre	12	2	12	0	0	1	2		0	0	29
Octubre	16	0	51	0	2	3	2	2	0	0	76
Total	117	5	98	1	8	15	10	9	1	1	264

En la figura 1, se observan fotografías representativas de los insectos colectados con diferentes grados de infección por los hongos y la morfología característica de los órdenes identificados:

coleóptera, vista dorsal (1A) y vista ventral (1B); no identificado (1C, 1D); Blatodea, vista dorsal y ventral (1E, 1F); Hemíptera (1G) y Coleóptera (1H).

Aunque en la mayoría de los ejemplares no se logró la clasificación, se logró identificar los órdenes que han sido reportados como blanco de infección de hongos, como los Coleópteros, Himenóptera, Ortóptera y Hemípteros (Tanada y Kaya, 1993). El alto de grado de descomposición de los ejemplares no identificados pudo deberse Según García *et al.*, 2011, a que está fuertemente influenciada por la interacción de microorganismos del suelo, que aprovechan oportunidades para poder infectar nuevos nichos y que mejor que estos que están inmóviles.

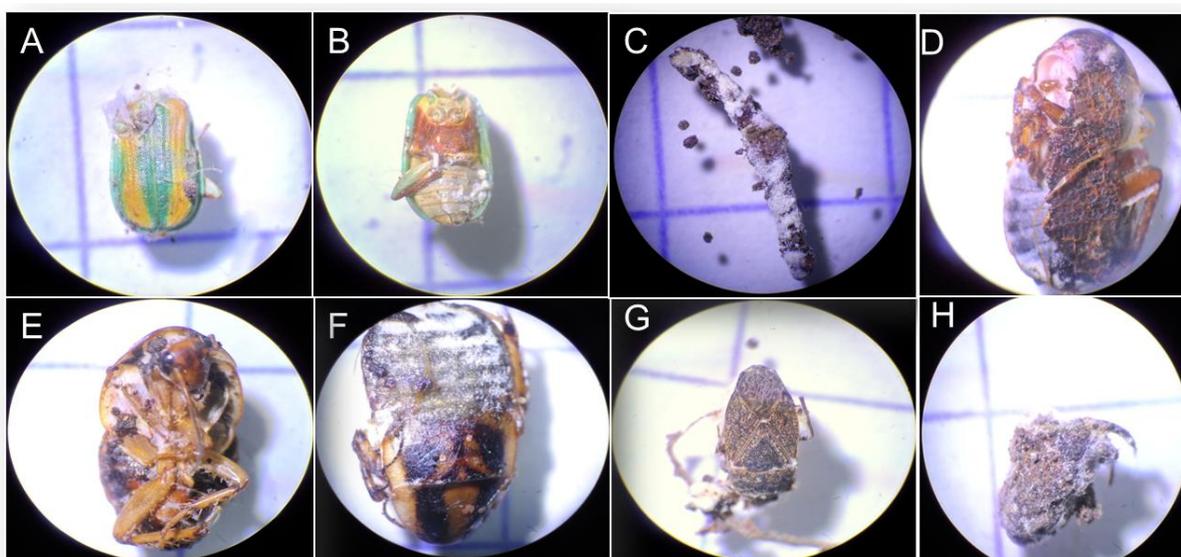


Figura 1. Insectos representativos de infección de los órdenes identificados. A y B, vista dorsal y ventral de un coleóptero; C y D, organismo no identificado por el grado de descomposición; E y F, Vista dorsal y ventral de Blatodea; G, vista dorsal de un Hemíptero y H, Vista dorsal de un Coleóptero.

Posteriormente se realizó un análisis de biodiversidad frente a la dominancia con una curva de rango-abundancia, comparando la riqueza y abundancia de insectos infectados en dos tipos de vegetación predominante en la zona. Como se observa en la figura 2, no hay diferencia en cuanto a la riqueza de órdenes encontrados en los dos tipos de vegetación (Pino-Encino y Cedro), sin embargo, se puede observar, que el Orden identificado más abundante en ambos tipos de vegetación corresponde a Coleóptera. También se logra observar que en el bosque de Pino- Encino se encontró un mayor número de coleópteros infectados en comparación con el bosque de Cedro. Esto corresponde a lo reportado por Colli *et al.* (2015), donde se encontró que el bosque de Cedro presenta una menor riqueza de familias y el bosque de Pino-Encino una mayor riqueza de Familias de Coleópteros, aunado a que el bosque de Cedro, es un área de suelo pobre ya que los árboles se encuentran desprovistos casi en su totalidad de follaje, por lo que la materia orgánica presente en el suelo es casi nula, no permitiendo el desarrollo de los hongos (Brown *et al.*, 2001) o solo de algunas especies comestibles. En comparación con el bosque de Pino-Encino el cual posee un sustrato más rico en nutrientes debido a la gran cantidad de materia orgánica en descomposición.

Los análisis de diversidad de hongos que infectan a los insectos, por análisis tipo RFLP, arrojaron 48 grupos relacionados filogenéticamente con base al número y tamaño de los fragmentos como se observa en la figura 3, que corresponde a los patrones de restricción obtenidos con las endonucleasas *HinfI* y *AluI* en un gel representativo de agarosa al 2 %.

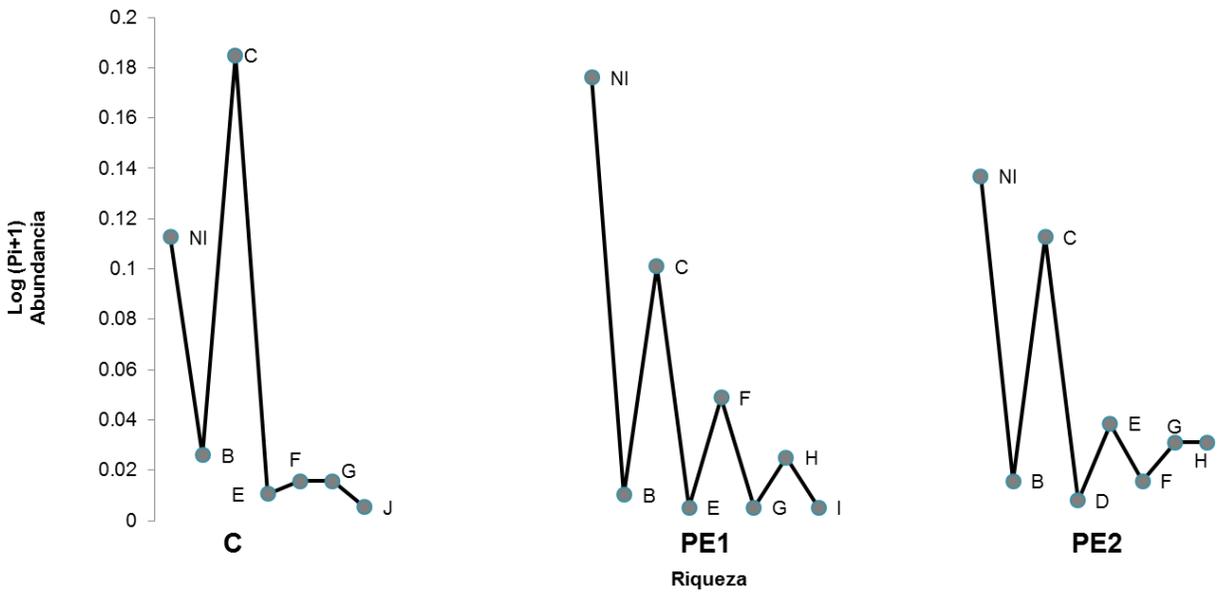


Figura 2. Curva de rango-abundancia para los artrópodos infectados en dos tipos de vegetación de la zona. Bosque de Cupressus (C), bosque de pino-encino (PE1 y PE2). NI, No identificados, B) Hemíptera, C) Coleóptera, D) Ortóptera, E) Miriópoda, F) Blatodea, G) Himenóptera, H) Díptera, I) Formicidae, J) Aranae.

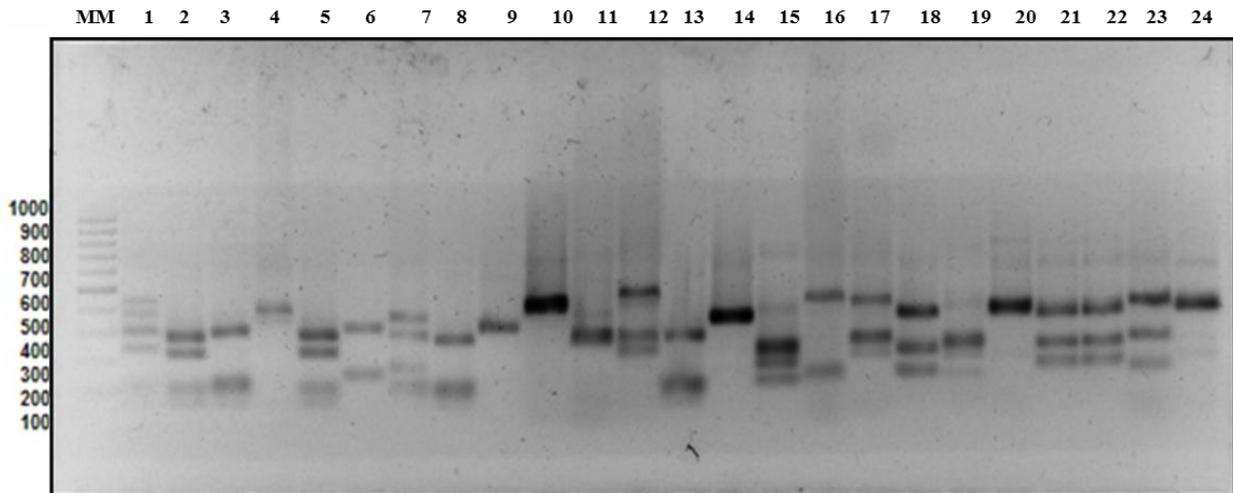


Figura 3. Gel de agarosa al 2 % donde se observan los productos de la restricción utilizando las enzimas *Hinf I* y *AluI*. En el primer carril se encuentra el marcador molecular de 100 pb. Los carriles 1-24 corresponden a los aislados fúngicos.

En el cuadro 2, se observan todos los grupos obtenidos del análisis tipo RFLP, éstos resultados de diversidad de hongos asociados a insectos es un reflejo de la complejidad del proceso de infección y colonización que llevan a cabo los hongos, tanto los asociados a los insectos que aparentemente no le causan daño, como para el proceso de infección y colonización de los insectos en el suelo en el proceso de descomposición de la materia orgánica.

Cuadro 2. Grupos relacionados filogenéticamente por análisis tipo RFLP de la región intergénica ITS. Los grupos se formaron con base al número y tamaño de los fragmentos.

13	3	390, 300, 200	13
14	2	300, 150	13
15	3	380, 350, 170	14
16	3	250, 200, 190	15
17	1	400	1, K1
18	3	400, 250, 200	3, 4
19	3	410, 280, 190	5
20	3	400, 270, 230	6
21	3	350, 250, 130	4', P, I, D
22	3	340, 240, 150	7
23	3	360, 240, 160	8, 35
24	2	420, 210	9, 29-R
25	4	290, 210, 100, 90	10, 12
26	2	350, 150	2'
27	2	380, 250	3'
28	2	400, 100	B, A, C1
29	3	400, 250, 190	136'P, 22
30	3	400, 250, 200	E
31	2	320, 110	B
32	2	450, 300	C
33	3	400, 250, 150	253
34	3	410, 300, 200	G
35	1	480	H
36	3	480, 200, 100	N, ?, R
37	3	300, 230, 110	P1, 186', N, O, N1
38	3	390, 250, 150	263, S
39	2	350, 190	42
40	3	390, 230, 160	B1, L1
41	3	300, 200, 100	136
42	3	350, 200, 150	21''P, M1
43	2	400, 350	Q
44	3	410, 350, 150	E1
45	3	250, 200, 100	Q1
46	2	250, 200	268
47	3	350, 300, 150	M1
48	3	300, 250, 200	N

## CONCLUSIÓN

Se identificaron siete órdenes de insectos infectados por hongos entre los que se encuentran, Coleóptera, Hemíptera, Himenóptera, Ortóptera, Blatodea, Formicidae y Díptera. Los Coleópteros fue el grupo de insectos más abundante que presentaron síntomas de infección seguido de Blatodea y Hemíptera en la comunidad el Ocotero, parte de la Sierra Gorda de Guanajuato. Además se identificaron otros grupos de Artrópodos como Miriápodos y Arañas. La mayor riqueza y abundancia de insectos infectados fue en el bosque Pino-Encino. Se obtuvieron 48 grupos de hongos relacionados por tipo análisis tipo RFLP asociados a los insectos, infiriendo el alto grado de complejidad del proceso de infección, colonización y descomposición de los insectos.

## Agradecimientos

Al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por las facilidades para llevar a cabo la presente investigación.

## Literatura Citada

- Alatorre, R. 2007. Hongos entomopatógenos. Pp. 127–143. In: Rodríguez-del Bosque, L, y H. C. Arrendomdo-Bernal (Eds.). *Teoría y aplicación del control biológico*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria y Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Allendes, G. 2007. *Evaluación de ocho cepas de nativas de Metarhizium anisopliae var. anisopliae (Metsh) Sorokin, para el control de Aleurothrixus floccosus (Maskell)*. Tesis Ingeniero Agrónomo. Valparaíso. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 40 p.
- Arnett, H. R. y R. L. Jr. Jacques, 1981. Guide to insects. Published by Simon and Chuster. New York. 350 p.
- Brown, G. C., Fragoso, I., Barros, P., Rojas, J., Patron, J., Bueno, A., Moreno, P., Lavelle, V., Ordaz y C. Rodríguez. 2001. Diversidad y rol funcional de la macrofauna edáfica en los ecosistemas tropicales mexicanos. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)* 1(1): 79–110.
- Brown, K. S. 1982. Paleogeology and regional patterns of evolution in neotropical forest butterflies. Pp. 255–308. In: Prance, G. T. (Ed.). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press. N.Y. U.S.A.
- Borrow, D., Triplethorn, C. and N. Johnson. 1989. An introduction to the study of insects. 7<sup>th</sup> edition. Saunders Collegue Publishing. New York. 365 p.
- Colli, M. J. G., Hernández, Z. M. J., De la Riva, D. L. R. G. y H. V. Hernández. 2015. Diversidad de Coleópteros en la comunidad “el ocotero” parte de la Reserve de la Biósfera de la Sierra Gorda de Guanajuato. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2(3): 415–422.
- Favila, M. E. and G. Halffter. 1997. The use of indicator groups for measuring biodiversity as related to community structure and function. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)* 72: 1–25.
- García, G. M. A., Cappello-García S., Leshner-Gordillo J. M. y R. F. Molina Martínez. 2011. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Salud Pública*, 10(2): 3–6.
- Gillot, C. 2005. Entomology. Third Edition. Springer. Netherlands. 305 p.
- Halffter, G. and M. Ros. 2013. A strategy for measuring biodiversity. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)* 29(2): 400–411.
- Hernández, V. V. M. Berlanga-García, A. M. y E. Garza-González. 2008. Detección de *Metarhizium flavoviride* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en la isla Socorro, archipiélago de Revillagigedo, México. *VEDALIA*, 4: 45–46.
- Martí, P. F. 1997. Apuntes sobre Biodiversidad y Conservación de Insectos: Dilemas, Ficciones y ¿Soluciones? *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 20(1): 25–55.
- Morón, M. A., Ratcliffe, B. C. y C. Deloya. 1997. *Atlas de los escarabajos de México (Coleoptera: Lamellicornia), Vol. 1. Familia Melolonthidae (subfamilias Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae, Trichiinae, Valginae y Melolonthinae)*. Sociedad Mexicana de Entomología/ Conabio, México, D. F. 280 p.
- Pearson, D. L. and F. Cassola. 1992. World-wide species richness patterns of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): indicator taxon for biodiversity and conservation studies. *Conservation Biology*, 6(1): 376–391.
- Skroch, P. W and J. Nienhuis. 1995. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(6-7): 1078–108.
- Tanada, Y. and H. Kaya. 1993. Insect pathology. Prensa Academica, San Diego, CA, EUA. 666 p.
- Torres, G. J. C., Salazar-Solís, E. y M. García-Esquivel 2012. Diversidad de cepas del hongo patógeno de insectos *Metarhizium anisopliae*”. La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado. Vol. II. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (IEE).