

DIVERSIDAD DE HONGOS ASOCIADOS A INSECTOS EN PRIMAVERA Y VERANO EN CHARCO AZUL, XICHÚ, PARTE DE LA SIERRA GORDA DE GUANAJUATO

Zuñiga-Zuñiga Alejandro¹ y Colli-Mull Juan Gualberto²

^{1,2}Instituto Tecnológico superior de Irapuato. Carretera Irapuato Silao km. 12, 5 col. El copal, C.P. 36821, Irapuato Guanajuato México. ¹licenciatura en biología, ¹torndanes@hotmail.com, ²jcolli@itesi.edu.mx

Resumen

Los insectos representan el grupo de animales más abundante y biodiverso del planeta con cerca de 1,000 000 de especies descritas. Presentan amplia gama de roles ecológicos importantes, como polinizadores, descomponedores y otras funciones. Sus poblaciones son reguladas por interacciones ecológicas como la depredación, simbiosis, mutualismo, comensalismo y parasitismo. Particularmente, en el parasitismo son regulados por hongos conocidos como entomopatógenos. Se colectaron en total 264 insectos infectados en primavera y verano del 2014. La mayor abundancia se obtuvo en verano, sin embargo, en primavera se observó una riqueza más alta. Se aislaron 85 hongos distintos de los 264 colectados. El orden coleóptera fue uno de los 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.

ABSTRACT

Insects represent the most abundant and biodiversity animals group on the planet with nearly 1,000,000 described species. They have wide range of important ecological roles as pollinators and decomposers, and other functions. Their populations are regulated by ecological interactions such as predation, symbiosis, mutualism, commensalism and parasitism. Particularly in the parasitism they are regulated by fungi known as entomopathogenic. 264 infected Insects were collected in spring and summer of 2014. The highest abundance was obtained in summer, however, higher richness in spring was observed. 85 different fungi were isolated.. The Coleoptera order was one of the mostly infected followed by blattodea and Hemiptera. RFLP analysis on intragenic region of the ITS, we identified 48 phylogenetic related groups of fungi, representing a high diversity of fungi associated with the regulation of insect populations in a natural ecosystem.

INTRODUCCIÓN

Los insectos, son el grupo de organismos más abundante y diverso sobre la tierra, invadiendo la mayoría de los ambientes terrestres y acuáticos que existen (1). Recientemente, se han considerado las ventajas de utilizar este grupo en estudios de biodiversidad debido a su abundancia, ecología, y facilidad de captura (2).

Se les consideran un grupo importante para la evaluación de cambios antropogénicos en ecosistemas naturales, así como para el monitoreo de la conservación de la biodiversidad (3), ya que desempeñan numerosos papeles en el ecosistema como polinizadores y descomponedores, así como a una amplia gama de aplicaciones potenciales.

Recientemente se realizó un estudio, donde se determinó la diversidad de familias de coleópteros en la Sierra Gorda de Guanajuato, donde se evaluaron dos tipos de vegetaciones (bosque de Pino-Encino y bosque de Cupressus), observando que el bosque de Pino-Encino tiene una mayor diversidad comparado con un bosque de Cupressus, entre las familias más abundantes se encontró Curculionidae, Nitidulidae y Carabidae (4).

Las poblaciones naturales de insectos juegan papeles críticos en los ecosistemas, donde 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 (HE) 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 (5). A través de la distintas estaciones del año, los HE se pueden encontrar en dispersión, latencia o infección. Para esto,

diversos factores influyen en el desarrollo de los HE, algunos como el tipo de sustrato, la temperatura y el hospedero (6). La temperatura es un factor importante en el crecimiento, entre 8-37 °C se desarrollan la mayoría de los hongos entomopatógenos, en cambio para la infección varía mucho mas, por ejemplo temperaturas altas (mayores de 40 °C) pueden reducir la duración del estadio del insecto, no lográndose la penetración cuticular (7). Otro factor importante es la humedad relativa, ya que requieren periodos de alta humedad para lograr la germinación y longevidad de las esporas (8). Al igual que los factores mencionados anteriormente, la luz resulta importante estimulando el crecimiento micelial, cuando es alta (longitud de onda de la luz ultravioleta), los conidios pierden su viabilidad, a un nivel medio puede inducir una rápida proliferación de esporas. Todos estos factores se pueden observar cambiantes en las distintas estaciones del año, sin embargo, es la época de lluvias es donde aumenta la temperatura y la humedad, estimulando el crecimiento de muchos hongos entomopatógenos (9).

Dentro del grupo de los insectos, infectan en su gran mayoría a los órdenes Hemíptera, Díptera, Coleóptera, Lepidóptera, Himenóptera y Ortóptera (10). Entre las especies más representativas de hongos entomopatógenos se encuentran: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y *Cordyceps militaris* (11). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estimar la riqueza y abundancia de insectos infectados en dos épocas del año, primavera y verano del 2014, así como la diversidad de hongos asociados a los insectos por marcadores tipo RFLP en la comunidad de El Ocotero Xichú, que es parte de la Reserva de la Biósfera Sierra Gorda de Guanajuato.

MATERIALES Y MÉTODOS

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-Octubre) del año 2014. Los insectos colectados fueron seleccionados por presentar los síntomas de patogenicidad; presencia de micelio o inmovilidad (12). 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 (13, 14, 15).

Los hongos se aislaron por siembra directa, tomando una parte del insecto infectado y colocándolo directamente en el 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 horas. Los hongos fueron aislados de las placas de cultivo.

Se analizaron los datos obtenidos y se realizó una curva de rango-abundancia (16).

Para obtener el DNA genómico total (17), se utilizó el protocolo, con algunas modificaciones. 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. Los productos de PCR de la región ITS, fueron digeridos con las endonucleasas Hinf I y Alu I a 37° C por 2h. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 2%. Los productos de la restricción se agruparon 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 infectados más abundantes fueron: Coleóptera, Blattodea y Hemiptera con 90, 15 y 10 organismos respectivamente. La estación con menor número insectos infectados fue en primavera (marzo, abril, mayo y junio). Por otro lado, 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 (tabla 1). Los órdenes menos infectados fueron Formicidos y Ortópteros, Muchos ejemplares no fueron identificados por el grado de infección que presentaban. El orden coleóptera fue el orden más abundante en las dos épocas del año, esto corresponde con lo reportado (4), en donde se encontraron 734 organismos que se agrupan en 14 Familias de Coleópteros.

Fecha	Ni	H	C	O	M	B	Hi	D	F	A	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	1	9	0	0	2	2	1	0	0	30
Septiembre	12	2	12	0	0	1	2	0	0	0	29
Octubre	16	0	51	0	2	3	2	2	0	0	76
Total	64	3	72	0	3	6	6	3	0	0	157

Tabla 1: Total de insectos colectados. Ni (no identificado), H (hemiptera), C (coleóptera), O (ortóptera), M (miriápoda), B (blatodea), Hi (himenóptera), D (díptera), F (formicidae), A (araneae).

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); Blattodea, vista dorsal y ventral (1E, 1F); Hemiptera (1G) y Coleóptera (1H).

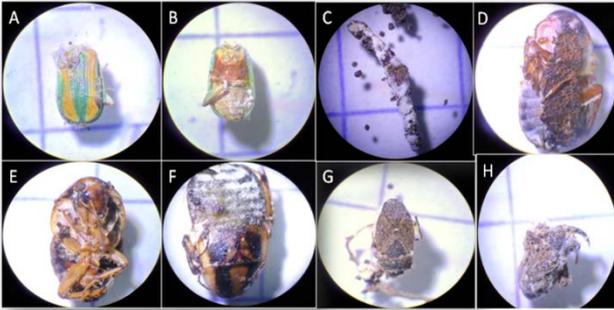


Figura 1. Insectos representativos de infección de los órdenes identificados.

Se realizó un análisis de diversidad frente a la dominancia con una curva de rango-abundancia o curva de Whittaker. Se comparó la riqueza y abundancia de órdenes de insectos infectados en primavera y verano. La estación con mayor abundancia y riqueza fue el verano. Se denominaron abreviaturas para los tipos de familia y de vegetación (ver figura 2).

Como se observa en la figura 2, hay una mayor abundancia en Verano, representado con los dos picos (A: No identificados y C: Coleóptera). Sin embargo en primavera se observa una mayor cantidad de órdenes, representados por las letras de la A a la J.

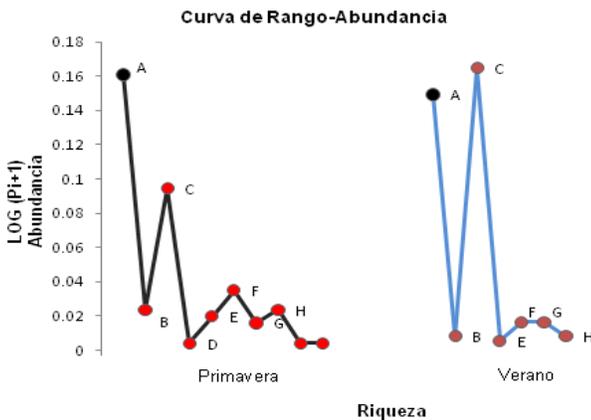


Figura 2. Curva de rango-abundancia para las estaciones de Primavera y Verano de 2014.

Se realizó un análisis de restricción tipo RFLP a 72 productos de PCR's utilizando las enzimas Hinf I y Alu I. Este análisis dio como resultado 48 grupos relacionados filogenéticamente con base a los patrones de restricción, lo que sugiere una gran diversidad de hongos asociados a insectos en la

zona de estudio. En la figura 3, 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 en un ambiente natural, donde los factores como la temperatura, humedad, radiación, sustrato juegan un rol importante en el proceso de infección y colonización de los insectos.

Grupo	# de fragmentos	Fragmentos	# de Aislado
1	5	450, 380, 310, 250, 120	10
2	2	300, 130	7
3	1	410	9, 3, 1', 26, H1
4	1	350	10, R, Q1
5	3	290, 230, 120	6, 10
6	4	350,	14
7	1	290, 180, 100	1, 210
8	1	320	4
9	3	280	4
10	2	450, 280, 250	5
11	3	340, 150	6, 15, 23
12	3	240, 200, 150	11
13	2	400, 170	12
14	3	390, 300, 200	13
15	2	300, 150	13
16	3	380, 350, 170	14
17	3	250, 200, 190	15
18	1	400	1, K1
19	3	400, 250, 200	3, 4
20	3	410, 280, 190	5
21	3	400, 270, 230	6
22	3	350, 250, 130	4', P, I, D
23	3	340, 240, 150	7
24	3	380, 240, 180	8, 35
25	2	420, 210	9, 29-R
26	4	290, 210, 100, 90	10, 12
27	2	350, 150	2'
28	2	380, 250	3'
29	2	400, 100	B, A, C1
30	3	400, 250, 190	138' P, 22
31	3	400, 250, 200	E
32	2	320, 110	B
33	2	450, 300	C
34	3	400, 250, 150	253
35	3	410, 300, 200	G
36	1	480	H
37	3	480, 200, 100	N, 7, R
38	3	300, 230, 110	P 1, 188', N, O, N1
39	3	390, 250, 150	283, S
40	2	350, 190	42
41	3	390, 230, 160	B1, L1
42	3	300, 200, 100	138
43	3	350, 200, 150	21'' P, M1
44	2	400, 350	Q
45	3	410, 350, 150	E1
46	3	250, 200, 100	Q1
47	2	250, 200	268
48	3	350, 300, 150	M1
49	3	300, 250, 200	N

Figura 3. Análisis tipo RFLP con los grupos relacionados filogenéticamente.

CONCLUSIONES

Se identificaron siete órdenes de insectos infectados por hongos entre los que se

encuentran, Coleóptera, Hemíptera, Himenóptera, Ortóptera, Blatodea, Formicidae y Díptera. El orden más abundante fue coleóptera, seguido de Blatodea y Hemíptera. Se observó una mayor riqueza de insectos infectados en los meses de marzo-junio, pero la mayor abundancia fue en los meses de julio-octubre (verano). Esto debido a la temperatura media y al incremento de la humedad relativa, que coincide con el inicio de las lluvias. También la estructura vegetal promueve que la radicación solar que afecta la germinación de conidias y esporas sea baja. 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.

REFERENCIAS

- [1] Schowalter Timothy D., 2011. Insect Ecology. An Ecosystem Approach. Third Edition. Elsevier. Louisiana State University. Pp: 8-18.
- [2] Brown, G. C., Fragozo, 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.
- [3] Halffter, G. and M. Ros. 2013. A strategy for measuring biodiversity. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 29(2): 400-411.
- [4] 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 Reserva de la Biosfera de la Sierra Gorda de Guanajuato. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2(3): 415-422.
- [5] 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.
- [6] Rath A. C., 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. *Biocontrol Science & Technology*. Vol. 10., Pp. 563-581.
- [7] López L.V., Hans Börje J. Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad* 2001; 6: 12-15.
- [8] González Reyes A., 2003. Efecto de la temperatura, humedad relativa y humedad de suelo, sobre la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) en larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). Tesis doctoral. Universidad de Colima. Pp: 32-58.
- [9] Ortiz-Catón M.; Alatorre-Rosas R.; Valdivia-Bernal R.; Ortiz-Catón A.; Medina-Torres R., Alejo-Santiago G., 2011. Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit. Rev. Biociencias*, Vol. 1., No. 2., Pp: 42-53.
- [10] Tanada, Y. y H. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Prensa Académica, San Diego, CA, EUA. 666 p.
- [11] 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).
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Gillot, C. 2005. *Entomology*. Third Edition. Springer. Netherlands. 305 p.
- [15] Arnett, H. R. y R. L. Jr. Jacques, 1981. *Guide to insects*. Published by Simon and Chuster. New York. 350 p.
- [16] Moreno E. C., 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. CYTED. Sociedad Entomológica Aragonesa. 1era Edición, Vol. 1, 30 p.
- [17] Skroch, P. W y 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