

## LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### Objetivo

Herramientas basadas en el estudio del ADN en la actualidad son tecnologías indispensables para el desarrollo de programas de control biológico. Enfoques moleculares se están utilizando frecuentemente para identificar de forma inequívoca plagas, organismos benéficos y biotipos, y para descifrar las relaciones entre las especies (es decir, la sistemática). La identificación taxonómica exacta de las especies de plagas y enemigos naturales es reconocida como el primer paso esencial en el desarrollo de programas de control biológico de éxito. La incorrecta identificación puede provocar el fracaso del proyecto o significativamente detener el impulso hacia adelante. Por esta razón, el objetivo principal del laboratorio es la identificación y tipificación molecular de los organismos benéficos depositados en las colecciones de insectos entomófagos (CIE) y hongos entomopatógenos (CHE) del CNRCB, incluyendo los organismos de los programas de plagas reglamentadas.

### Justificación

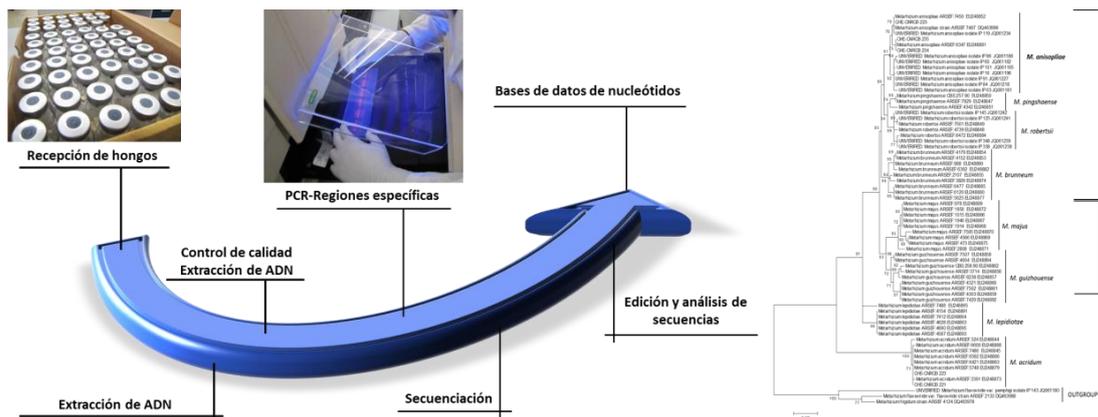
La taxonomía y sistemática han proporcionado el concepto de la existencia de especies crípticas, es decir, organismos que pueden diferir en su biología, ecología y comportamiento, pero no pueden ser identificados de forma confiable utilizando datos morfológicos. Sin embargo, la variación en el nivel molecular puede ser detectable y podría ser lo suficientemente grande como para justificar su reconocimiento como entidades biológicas separadas (las diferencias moleculares en el nivel de ADN son mayores entre las diferentes especies que dentro de la misma especie, debido a que la divergencia de secuencias es inferior entre individuos de una especie que entre las especies que están estrechamente relacionadas), incluso cuando las poblaciones son simpátricas. Además, la identificación taxonómica permite la comprensión de las asociaciones existentes entre las especies (ed., huésped o presa, plantas hospederas, preferencias de microhábitats, biotipos, distribución geográfica...). Esta información es esencial en el descubrimiento de enemigos naturales nuevos y viables, además de la selección de especies y biotipos apropiados para su utilización como agentes de control biológico. Así, la identificación del organismo es fundamental e importante en todas las etapas y fases, como: (1) Exploración; (2) importación; (3) cría masiva y liberación; y (4) evaluación.

Sin embargo, la identificación a nivel de especie (información esencial) es una caracterización parcial de los organismos. Existen varias razones por las cuales es necesario caracterizar los organismos benéficos más allá del nivel especie y determinar la sub-especie o cepa según corresponda, por ejemplo, uno de los puntos más críticos

en el desarrollo de un programa de control biológico es la posibilidad de rastrear el organismo después de la aplicación al ambiente para evaluar su eficiencia. Para alcanzar este objetivo, el primer paso es realizar una evaluación/estimación cualitativa acerca de la biodiversidad del microorganismo en el ecosistema y después de desarrollar marcadores moleculares específicos al organismo. En este sentido, el laboratorio está caracterizando los organismos benéficos acorde a una estrategia multigenética (MultiLocus Sequence Typing) y además está desarrollando otros marcadores moleculares (ej. microsátelites, inter-microsátelites...) para lograr una amplia tipificación y de esta manera permitir en un futuro su rastreo.

## Identificación Molecular de Hongos Entomopatógenos

El LBM apoya en la identificación molecular de los aislados depositados en la CHE, de esta manera no sólo la determinación específica se realiza por métodos tradicionales sino que se involucra la secuenciación de diferentes regiones de ADN (zonas intergénicas, genes estructurales, funcionales y ribosomales). Para la identificación de hongos entomopatógenos, el LBM estandarizó e implementó una estrategia multigenética (MLST, por sus siglas en inglés) que conlleva la concatenación de tres o más regiones de ADN elegidas en base a su poder de discriminación y resolución. El procedimiento incluye, la extracción de ADN de cada muestra(s), la selección y amplificación por PCR de los distintos marcadores moleculares y el análisis bioinformático (edición de secuencias y construcción de árboles filogenéticos bajo diferentes métodos de reconstrucción filogenética: ej. Neighbour Joining, Máxima Verosimilitud, Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana) (Fig. 1).



**Figura 1.** Estrategia experimental para la identificación molecular de hongos entomopatógenos.

De esta manera, la sistemática molecular y los análisis filogenéticos realizados para cada una de las muestras, proporcionan una aproximación confiable y certera. La Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV-SENASICA) a través del CNRCB, promueve el uso de hongos entomopatógenos en programas oficiales (Cuadro 1) para el combate de plagas

agrícolas, por lo que es sumamente importante el establecimiento de una precisa identificación. A la fecha, el LBM ha identificado 263 aislados de la CHE principalmente hongos de los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Hirsutella*, *Akanthomyces* y *Simplicillium*, entre los cuales se incluye todos los aislados utilizados en programas oficiales para el control biológico de plagas en México (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Aislados de la Colección de Hongos Entomopatógenos (CHE) identificados a nivel molecular que son utilizados en programas oficiales para el control biológico de plagas en México.

Clave CHE	Clave inicial	Identificación inicial	Identificación actual	Programa oficial
CHE-CNRCB 303	Pf15	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Cordyceps javanica</i>	Huanglongbing/Pulgón café
CHE-CNRCB 305	Pf17	<i>I. fumosorosea</i>	<i>C. javanica</i>	Huanglongbing
CHE-CNRCB 307	Pf21	<i>I. fumosorosea</i>	<i>C. javanica</i>	Huanglongbing
CHE-CNRCB 224	Ma59	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i> sensu lato	Huanglongbing
CHE-CNRCB 206	Ma41	<i>Metarhizium acridum</i>	<i>M. acridum</i>	Langosta
CHE-CNRCB 213	Ma49	<i>M. acridum</i>	<i>M. acridum</i>	Langosta

## Identificación Molecular de Insectos Entomófagos

La biodiversidad de insectos comprende la variedad de ecosistemas, especies y genes, por esta razón es una prioridad acelerar su descripción y conservación. El LBM contribuye estrechamente con la CIE en la determinación molecular de los organismos con el fin de complementar y enriquecer la identificación taxonómica realizada por la colección. Actualmente, el LBM realiza protocolos destructivos y no destructivos del tejido de ejemplares de insectos para la obtención de ADN, así como estrategias que permiten la identificación al nivel género o especie, por medio del código de barras de la vida, principalmente en el empleo del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) (Fig. 2).

Los resultados en esta línea de investigación, se encuentran reflejados en el establecimiento y adecuación de protocolos específicos para obtener buena calidad del ADN de cada espécimen, así como protocolos que permitan obtener ADN de ejemplares únicos, con gran valor científico o de más de 20 años de colecta y aun así, conservar las características morfológicas en buenas condiciones. Adicionalmente, se ha logrado la estandarización de protocolos de PCR para las regiones COI con diversos primers y la estandarización de varias otras regiones de ADN. Hasta la fecha, se han identificado 204 especímenes de insectos de los órdenes Neuroptera, Coleoptera, Diptera y Hymenoptera resguardados en la CIE.



**Figura 2.** Estrategia experimental para la identificación molecular de insectos entomófagos.

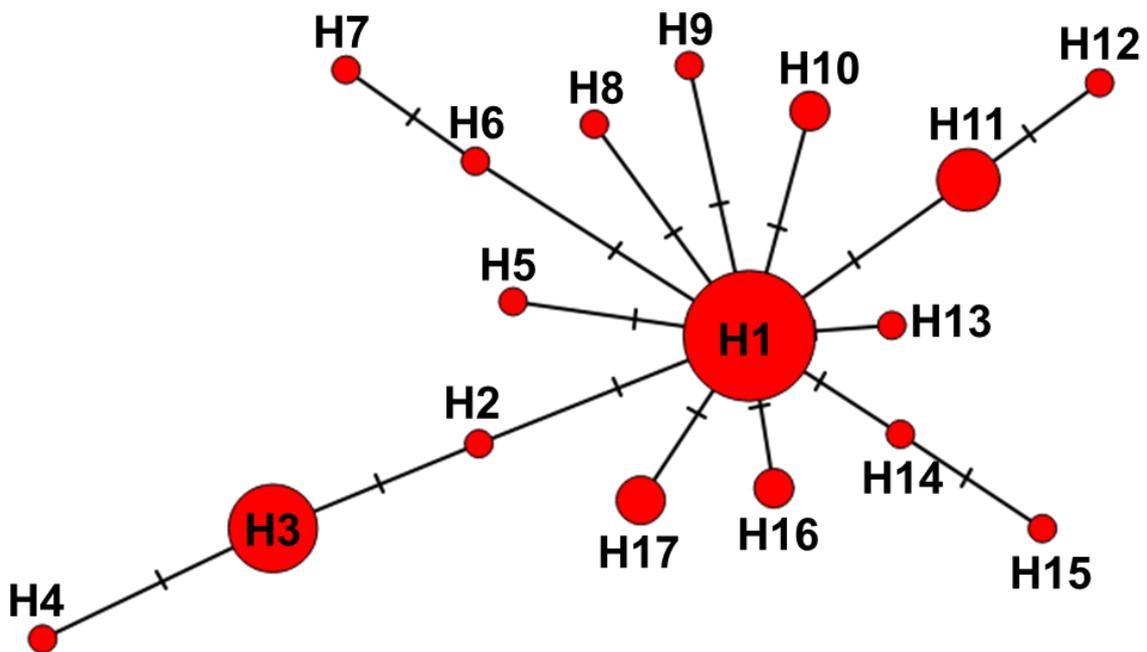
El LBM, pretende consolidar una “metodología de identificación molecular” o “taxonomía por ADN” a partir de poco material de diferentes insectos y en el futuro, lograr la determinación de especies crípticas o con ciclo de vida parcialmente/totalmente desconocido para contribuir con información nucleotídica a la base de datos electrónica que está siendo desarrollada por la CIE.

## Tipificación molecular de los organismos benéficos

La evaluación de la diversidad genética es un enfoque importante en la investigación de la biología, ecología y evolución de una especie (ej. permite examinar la dinámica de población, patrones de migración...); en el caso de los organismos benéficos, este conocimiento es fundamental. De hecho, el desarrollo de protocolos y la aplicación de estos organismos necesitan una profunda comprensión de la estructura genética de la población en los diferentes nichos ecológicos, así como la dinámica de la población. Además, el monitoreo/rastreo de las cepas de control biológico en el ambiente requiere de una caracterización genética hasta nivel genotípico con una alta resolución.

Para responder a las necesidades de una tipificación de alta resolución, el laboratorio ha desarrollado principalmente dos tipos de análisis: el estudio de los haplotipos en insectos entomófagos con la secuenciación del gen COI y los microsatélites (Simple Sequence Repeat, SSR) en hongos entomopatógenos. Los SSR son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva, mientras que los ISSRs amplifican las regiones internas de los SSRs. Los SSR son actualmente uno de los marcadores más adecuados para la determinación genotípica y en la evaluación de la diversidad dentro de las especies. Por ejemplo, estos marcadores fueron desarrollados para la determinación del genotipo de cepas que contiene el complejo de especies *M. anisopliae*, teniendo éxito para la investigación de la diversidad molecular de diferentes colecciones.

A la fecha, el laboratorio está aplicando la técnica de marcadores SSRs para la caracterización genotípica de aislados de hongos entomopatógenos utilizados en programas de plagas reglamentadas (ej., *M. anisopliae*: Huanglongbing (HLB) de los cítricos; *M. acridum*: Langosta y Chapulín) o con alto potencial (ej., *B. bassiana*: cultivo de aguacate). Adicionalmente, se ha usado la técnica de los haplotipos del gen COI para lograr una evaluación de la diversidad genética de las poblaciones de *Ceraeochrysa cubana* y *Ceraeochrysa valida* (HLB de los cítricos) presentes en el estado de Colima. Además, se está desarrollando la misma técnica para evaluar la diversidad genética de la especie *Cycloneda sanguinea sanguinea* (alto potencial para el control biológico de varias plagas) en agroecosistema de México (Fig. 3).



**Figura 3.** Red de haplotipos inferidos por el método "TCS network" basado en las secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) de cincuenta y cinco especímenes de *C. s. sanguinea* de México.

### Actividades adicionales

- 1- Evaluación de la estabilidad genética de hongos entomopatógenos antes y después de ser sometidos a diferentes métodos de conservación. La determinación se hace con la técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés); la finalidad de este proyecto es apoyar a la CHE en la selección de los mejores métodos de conservación.
- 2- Apoyo para el control de calidad en la reproducción masiva de insectos entomófagos (ej. parasitoides como *Leptopilina boulardi* o *Anagyrus kamali*, especímenes del complejo de especies *Chrysoperla carnea*, entre otros).

- 3- Secuenciación (con técnicas de nueva generación) y análisis de genoma total de diferentes aislados de la especie *Cordyceps javanica*, incluyendo los aislados utilizados en el programa contra el “Huanglongbing” de los cítricos. A largo plazo, este estudio sobre proporcionará un profundo análisis al nivel génico, de factores transcripcionales, involucrados en diferentes aspectos como mecanismos de infección, virulencia, resistencia a la temperatura, entre otros, que podrían mejorar las estrategias de control biológico
- 4- Desarrollo de una técnica alternativa de identificación molecular multigénica con secuenciación de nueva generación para permitir el análisis de grande cantidad de muestras de hongos entomopatógenos de manera confiable y rápida.
- 5- El laboratorio recibe estudiantes de licenciatura, ingeniería, maestría y doctorado para la realización de estancias profesionales y desarrollo de tesis.