



Short note [Nota corta]

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Metarhizium anisopliae* AISLADOS DE INSECTOS Y AGROECOSISTEMAS †

[GENETIC DIVERSITY OF *Metarhizium anisopliae* ISOLATED OF INSECTS AND AGROECOSYSTEMS]

**Merary Nataly Ramírez-Milanes, Roberto Lezama-Gutiérrez,
Juan Carlos Sánchez-Rangel, Wilberth Chan-Cupul,
Marco Tulio Buenrostro-Nava and Gilberto Manzo-Sánchez***

*Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Km 40
Autopista Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, México CP 28930. Email:*

gmanzo@ucol.mx

**Corresponding author*

SUMMARY

Background. The genus *Metarhizium* is integrated of various species, they have a wide geographic distribution and are considered one of the best biological control agents for pests insect. **Objective.** To determine the genetic diversity of *Metarhizium* strains isolated from different insects and agroecosystems using RAPD markers. **Methodology.** Soil was collected from different agroecosystems (Mexican lemon, grapefruit, sugar cane, mango), insects *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae), *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acridylus), *Macrodactylus murinus* (Coleoptera: Scarabaeidae), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and the mite *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolate *Metarhizium* strains, the isolates were analyzed through random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Results.** The RAPD markers were highly informative and polymorphic. The generated dendrogram was made up of four clusters (A-D); cluster A consisted of 11 soil isolates, one from *D. magnifactella* and two from *D. saccharalis*. In cluster B one of *D. saccharalis* and one of soil. On the other hand, in cluster C were that *B. microplus* and one of soil. While cluster D was integrated by the *S. frugiperda*, *M. murinus* and *S. piceifrons* isolates. **Implications.** The determination of the genetic diversity between *Metarhizium* isolates obtained from insects and agroecosystems, generates a contribution on the habitat that will allow the development of strategies to carry out an adequate biological control of pest insects. **Conclusion.** The analyzes using the RAPD markers indicated that there is a genetic diversity among the *Metarhizium* isolates collected from different insects and agroecosystems.

Key words: RAPD makers; entomopathogen fungi; molecular characterization.

RESUMEN

Antecedentes. El género *Metarhizium* está constituido por diversas especies, las cuales presentan una amplia distribución geográfica y es considerado uno de los mejores agentes de control biológico de insectos plagas. **Objetivo.** Determinar la diversidad genética de aislamientos de *Metarhizium* aislados de insectos y agroecosistemas mediante marcadores del ADN polimórfico amplificado al azar. **Metodología.** Para el aislamiento de *Metarhizium* se recolectaron suelos de diferentes agroecosistemas (limón mexicano, toronja, caña de azúcar, mango), de insectos *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae), *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae), *Macrodactylus murinus* (Coleoptera: Scarabaeidae), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y del acaro *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), estos se analizaron mediante marcadores RAPD. **Resultados.** Los marcadores RAPD fueron altamente informativos y polimórficos. El dendrograma generado estuvo conformado por cuatro grupos (A, B, C y D); el grupo A se conformó por 11 aislados de agroecosistemas, uno de *D. magnifactella* y dos de *D. saccharalis*. En el grupo B uno de *D. saccharalis* y uno de agroecosistema de limón. En cambio en el grupo C estuvieron los aislados de *B. microplus* y uno de suelo. Mientras que el grupo D estuvo conformado por los aislados de *S. frugiperda*, *M. murinus* y *S. piceifrons*. **Implicaciones.** La determinación de la diversidad genética entre aislados de *Metarhizium* obtenidos de insectos y agroecosistemas, genera una aportación sobre el hábitat que permitirá desarrollar estrategias para llevar a cabo un adecuado control biológico de insectos plaga. **Conclusión.** Los análisis mediante los marcadores RAPD indicaron la existencia de una diversidad genética entre los aislados de *Metarhizium* colectados de diferentes insectos y agroecosistemas.

Palabras clave: Marcadores RAPD, hongos entomopatógenos, caracterización molecular.

† Submitted June 22, 2021 – Accepted August 13, 2021. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.

INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Metarhizium* Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) son habitantes del suelo con una amplia distribución sobre diferentes hábitats (Hu y St. Leger, 2002), infectan un amplio rango de insectos plagas, los cuales algunos se han empleado como agentes de control biológico (Brunner-Mendoza et al., 2018), otros son endófitos y antagonistas de hongos fitopatógenos (Vega, 2018). Algunas especies de *Metarhizium* tienen un ciclo de vida multifuncional como patógenos de insectos y como simbiosis de plantas (Brunner-Mendoza et al., 2018), estos cuentan con un estado anamorfo y teleomorfo.

Los métodos clásicos para la identificación de hongos entomopatógenos, incluyendo a *M. anisopliae*, son basados en la morfología de sus esporas, características bioquímicas y propiedades inmunológicas (Entz et al., 2005). También, es frecuente encontrar diferentes morfologías debido a las diversas condiciones ambientales y fisiológicas en donde habitan los aislados (Hu y St. Leger, 2002; Entz et al., 2005).

El conocimiento de las composiciones de comunidades de hongos entomopatógenos y la estructura de sus poblaciones es importante para comprender su función ecológica y contribución a la regulación en su hospedante y su potencial como agente de control biológico (Meyling y Eilenberg, 2007). La estructura de la comunidad de hongos entomopatógenos en el suelo puede diferir notablemente entre campos agrícolas, siendo estos hábitats un refugio potencial para especies de *Metarhizium* y podrían proveer una fuente de inóculo para lograr recolonizar otros hábitats (Shneider et al., 2012).

A pesar de la importancia de *M. anisopliae* como agente de control biológico, la información sobre su diversidad genética es limitada (Oulevey et al., 2009). Se sabe que existe gran diversidad entre especies y entre poblaciones separadas geográficamente (Fegan et al., 1993; Fungaro et al., 1996; Driver et al., 2000). Sin embargo, se han realizado pocos estudios de diversidad intrapoblacional. Además, hay poca información de estos estudios en zonas tropicales donde la diversidad de organismos es mayor (Hughes et al., 2004; Riguetti et al., 2019).

Por ejemplo, Steinwender et al. (2014), en un estudio realizado en un agroecosistema en Dinamarca, obtuvieron de muestras de suelo 123 aislados y demostraron que la comunidad de *Metarhizium* estuvo compuesta por varias especies, predominantemente estas fueron *M. brunneum* seguido por *M. robertsii*, *M. majus* y *M. flavoviride*. Previamente, se reportaron que los suelos de campos agrícolas presentan una alta abundancia de especies de *Metarhizium*, comparado a

diferentes ecosistemas de la misma región, tales como forestales y pastizales (Bidochka et al., 1994; Bidochka et al., 2001). Mientras que, en un agroecosistema de caña de azúcar en el estado de Sao Paulo, Brasil, Iwanicki et al. (2019), determinaron una alta diversidad genética de especies de *Metarhizium* y su importancia como agente de control biológico del salivazo (*Mahanarva fimbriolata*) (Hemiptera: Cercopidae).

Recientemente, Riguetti et al. (2019), caracterizaron la diversidad genética y distribución de especies de *Metarhizium* en suelos agrícolas y nativos dentro de diferentes biomas de Brasil, demostrando que en vegetaciones nativas existió una mayor presencia de especies que las identificadas en cultivos anuales y perenes.

Es importante tener un conocimiento profundo de la presencia y distribución natural, la diversidad genética y la estructura comunitaria de las especies dentro de *Metarhizium* en agroecosistemas para evaluar sus efectos y el potencial para desarrollar estrategias para el control biológico (Meyling y Eilenberg, 2007). En base a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la diversidad genética de 31 aislamientos de *Metarhizium* aislados de insectos y agroecosistemas mediante marcadores del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *M. anisopliae*

En el presente estudio, 31 aislados de *Metarhizium* pertenecientes a la colección del Laboratorio de Control Biológico número uno de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima, la cual está compuesta por 264 aislados de *Metarhizium*. Los aislados se colectaron de diferentes regiones del estado de Colima, hospedero o sustrato de origen (Tabla 1).

Extracción del ADN

La reactivación de los hongos se llevó a cabo en medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (MCD Lab., México) enriquecido con extracto de levadura (1% p/v) y cloranfenicol (500 mg/L) en cajas Petri incubadas por 21 días (25 °C, HR 70%, 12 h luz/oscuridad). Posteriormente, las cepas se crecieron en matraces cada uno con 50 mL de Caldo Papa Dextrosa y mantenidos en un agitador orbital (Lab-line, E.U.A.) a una temperatura de 27 °C a 130 rpm durante 7 días. Enseguida, el micelio se colectó en papel filtro (previamente esterilizado) y enjuagado con agua destilada estéril, para eliminar los excesos del medio y a continuación se liofilizó. El micelio liofilizado se molió dentro de un mortero frío en

presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se colocaron aproximadamente 40 mg del polvo en tubos Eppendorf estériles de 2.0 mL con 1000 µL del amortiguador de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, NaCl 5 M, PVP 1%, CTAB 3%) y 10 µL de β-mercaptoetanol) y se mezclaron con ayuda del vortex e incubaron en baño María a 65°C durante 30 minutos en una incubadora digital (Isontemp waterbath, FisherScientific). Posteriormente, se adicionó 1 volumen (500 µL) de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló hasta formar un homogenizado; enseguida las muestras se centrifugaron en una centrifugadora digital

(Centrifuge 5804 R, Eppendorf) a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La fase acuosa obtenida se transfirió a tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL preenfriados en hielo y se agregaron 0.1 volumen de acetato de sodio 3.0 M pH 5.2, se mezcló con 0.6 volumen de isopropanol frío y se agitaron suavemente. Finalmente se secó la pastilla del ADN al vacío (Heto dry gel, Heto lab equipment) durante 15 minutos, y se resuspendió en un volumen de 20 µL de buffer TE estéril, las concentraciones fueron estimadas empleando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, MA, E.U.A.).

Tabla 1. Características de los aislados de *Metarhizium* spp. de Colima, México empleados en el presente estudio.

Clave	Hospedero o sustrato de origen	Lugar de origen	Grupo
M.a. 2	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Pyralidae).	Cuauhtémoc	A
M.a. 4	<i>D. saccharalis</i>	Cuauhtémoc	A
M.a. 138	<i>Diatraea magnifactella</i> (Lepidoptera: Pyralidae).	Quesería, Cuauhtémoc	A
M.a. 139	<i>D. magnifactella</i>	Cuauhtémoc	A
M.a. 140	<i>D. magnifactella</i>	Alcaraces, Cuauhtémoc	A
M.a.11	Suelo	Colima	A
M.a. 45	Agroecosistema de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.)	Jalipa, Manzanillo	A
M.a. 51	Agroecosistema de <i>C. aurantifolia</i>	Chiapa, Cuauhtémoc	A
M.a. 52	Suelo	La Caja, Comala	A
M.a. 54	Suelo	Minatitlán	A
M.a. 55	Agroecosistema de <i>C. aurantifolia</i>	La Capacha, Colima	A
M.a. 56	Agroecosistema de <i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	El Chivato, Villa de Álvarez	A
M.a. 57	Agroecosistema de <i>C. aurantifolia</i>	Nuevo Naranjal, Villa de Álvarez	A
M.a. 58	Agroecosistema de <i>C. aurantifolia</i>	Laguna Seca, Comala	A
M.a. 59	Agroecosistema de <i>C. aurantifolia</i>	Peñitas, Colima	A
M.a. 63	Agroecosistema de <i>Saccharum officinalis</i> (L.).	Quesería, Cuauhtémoc	A
M.a. 84	Agroecosistema de <i>S. officinalis</i>	“El Tanque”, Quesería, Cuauhtémoc	A
M.a. 92	Agroecosistema de <i>S. officinalis</i>	“Higuera”, Alcaraces, Cuauhtémoc	A
M.a. 147	Agroecosistema de <i>S. officinalis</i>	La Caja, Comala	A
M.a. 148	Agroecosistema de <i>S. officinalis</i>	Potrero el Escobero, Alzada, Cuauhtémoc	A
M.a. 113	Suelo	“Camichines”. Palmillas, Cuauhtémoc	A
M.a. 150	Agroecosistema de <i>S. officinalis</i>	Copalito, Cuauhtémoc	A
M.a. 151	Agroecosistema de <i>Mangifera indica</i> (L.).	Posgrado, FCBA, Tecomán	A
M.a. 152	Agroecosistema de <i>M. indica</i>	Posgrado, FCBA, Tecomán,	A
M.a. 13	Suelo	Colima	B
M.a.5	<i>D. saccharalis</i>	Cuauhtémoc	B
M.a. 131	<i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodidae)	Rancho “Las trancas”, Ixtlahuacán	C
M.a. 153	Agroecosistema de <i>C. aurantifolia</i>	San Buena Ventura, Manzanillo	C
M.a. 6	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).	Colima	D
M.a. 28	<i>Schistocerca piceifrons</i> (Orthoptera: Acrididae).	Colima	D
M.a. 10	<i>Macrodactylus murinus</i> (Coleoptera: Scarabaeidae).	Cuauhtémoc	D

Marcadores RAPD

La PCR se realizó de acuerdo con el protocolo de Cobb y Clarkson (1993). Cada muestra de reacción contenía 10 ng de ADN genómico de los aislados de *M. anisopliae*. Las mezclas de reacción se prepararon como sigue: buffer 1x, 2 mM de cloruro de magnesio, 100 μ M dNTPs, 0.56 μ M de cada uno de los oligonucleótidos (OPA-03, OPA-10, P-13, H-06, H-12, PLAT, GILS-2, AL-04 y H-18, ver Tabla 2) y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen). Las reacciones se realizaron en un termocicador GeneAmp PCR System thermal cycler (Applied Biosystem 9700, USA) con las siguientes condiciones de ciclaje: una desnaturalización de 94 °C por 4 min, seguido de 45 ciclos cada uno a 94 °C durante un minuto, a 36 °C un minuto y a 72 °C por dos minutos. La mezcla se someterá a un ciclo a una temperatura de 72 °C durante dos minutos para la elongación de la cadena (Cobb y Clarkson, 1993). La separación de productos de la PCR se realizó en gel de agarosa. Se colocaron 100 mL de amortiguador TAE 1X (Tris 1 M, ácido acético, EDTA 0.5 M, pH 8.0) al 1.5 % (p/v) de agarosa. Para la visualización de las bandas se tiñó el gel en una solución con bromuro de etidio aproximadamente 10 minutos y posteriormente se colocó en el fotodocumentador DNr Bio-Systems (MF-chemiBis 2; Israel).

RESULTADOS

Los aislados estudiados mostraron características típicas de *Metarhizium*, estos fueron basados en las características morfológicas de las colonias crecidas en medio PDA y en sus dimensiones de conidios (Fig. 1).

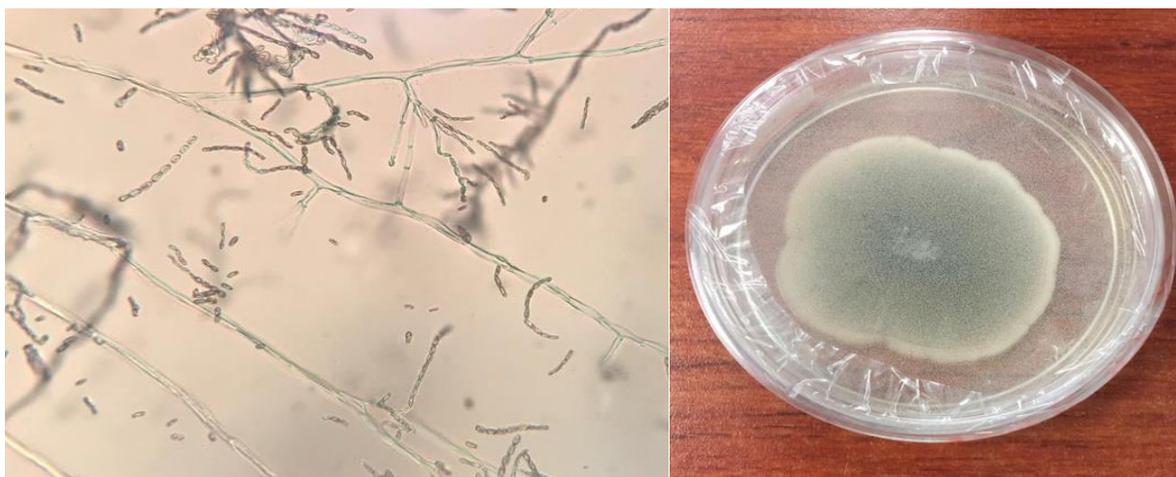


Figura 1. A: Conidios de *Metarhizium* **B:** Características morfológicas de colonia crecida en medio agar dextrosa Sabouraud a 28°C, a los 12 días de crecimiento.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos decámeros RAPD.

Oligonucleótido	Secuencia
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'
P-13	5'-GGAGTGCCTC-3'
AL-04	5'-ACAACGGTCC-3'
PLAT	5'-GACAGACAGA-3'
H-06	5'-ACGCATGGCA-3'
H-18	5'-GAATCGGCCA-3'
GILS-2	5'-CCGTGACTCA-3'

Los ocho oligonucleótidos usados para analizar los 31 aislados de *Metarhizium*, generaron un total de 58 bandas con un rango de tamaño de 250 pb a 2500 pb. El promedio de bandas por oligonucleótido fue de 7.2, de un total de 58 bandas totales. Los oligonucleótidos GILS-2 y P-13 arrojaron el mayor número de bandas (10 bandas por oligonucleótido), mientras que el oligonucleótido OPA-03 arrojó el menor número (4 bandas) (Fig. 2). El 100% de las bandas obtenidas con todos los oligonucleótidos fueron polimórficas.

Los análisis de agrupamiento mediante los marcadores RAPD indicaron que todas las cepas fueron caracterizadas por diferentes genotipos, demostrando una diversidad genética entre las 31 aislados de *Metarhizium*. El dendrograma obtenido muestra cuatro agrupamientos (A-D) con un promedio de coeficiente de similaridad de 0.58% (Fig. 3).

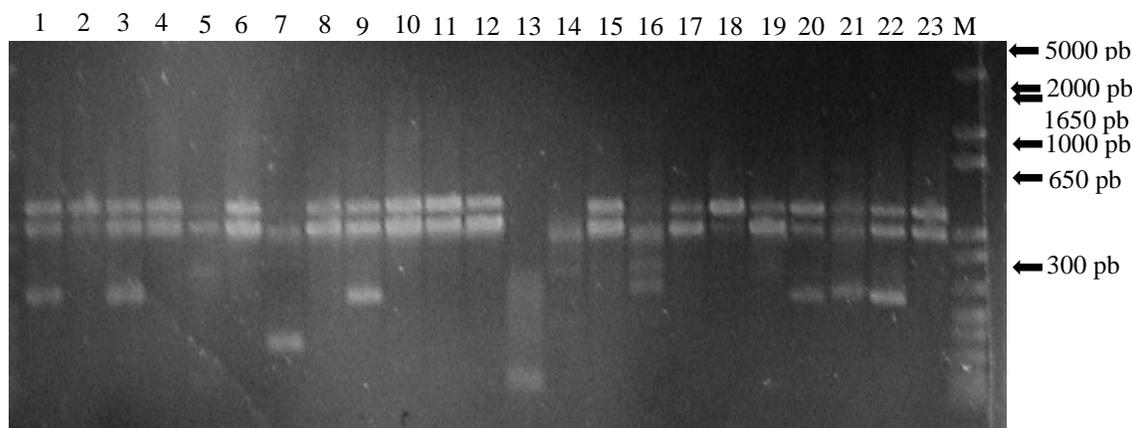


Figura 2. Parámetro de marcadores RAPD generados por el oligonucleótido OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3') en 23 aislamientos de *Metarhizium* (1-23) con el oligonucleótido (en orden 1-23), M.a . M: marcador de peso molecular (1 kb).

En el dendrograma se muestra el grupo A en el cual estuvo la mayoría de los aislados, los cuales fueron principalmente originarios de suelos (limón, toronja, caña de azúcar y mango), a excepción de M.a. 138, M.a. 139 y M.a. 140 (*D. magnifactella*) y M.a. 2 y M.a. 4 (*D. saccharalis*).

En el grupo B, se encontraron dos aislados M.a. 5 (*D. saccharalis*) y M.a. 13 (de suelo). En cambio, en el grupo C, estuvieron el aislado M.a. 131 (*B. microplus*) y M.a. 153 (suelo de limón mexicano). Mientras que el grupo D estuvo conformado por los aislados M.a. 6 (*S. frugiperda*), M.a. 10 (*M. murinus*) y M.a. 28 (*S. piceifrons*).

Nuestros resultados demuestran que los marcadores RAPD fueron útiles en la detección de diversidad genética dentro y entre aislados de *Metarhizium* procedentes de suelos e insectos.

DISCUSIÓN

Los marcadores RAPD se han utilizado ampliamente en varios estudios sobre diversidad genética de hongos entomopatógenos, incluyendo a *Metarhizium* (Bidochka *et al.*, 1994; Coob y Clarkson, 1993; Fegan *et al.*, 1993; Leal *et al.*, 1994; Navarro-Barranco *et al.*, 2019). Esta técnica provee varias ventajas y se ha demostrado que sus resultados son similares a los determinados por secuencias ITS entre aislados nativos de México y aislados referenciales de *Metarhizium* (Navarro-Barranco *et al.*, 2019). También fue capaz para detectar entre aislados Chilenos de *Metarhizium* alto nivel de diversidad genética con al menos cuatro oligonucleótidos decámeros RAPD (Becerra-Velazquez *et al.* 2007), mientras que en el presente estudio se emplearon nueve oligonucleótidos, los cuales fueron capaces de diferenciar genéticamente a

aislados de *Metarhizium* provenientes de suelo y de insectos.

En un estudio, realizado mediante marcadores RAPD se detectó una menor variabilidad genética entre los aislados de *Metarhizium* obtenidos de insectos, lo que sugiere un cierto grado de especificidad de huésped. Por lo que se propone que la variabilidad genética entre los aislados de insectos es mucho menor que la variabilidad genética observada entre los aislados del suelo. Este hecho sugiere que este hongo se ha desarrollado un cierto grado de especificidad del huésped (Fegan *et al.* 1993), lo que se demostró en el presente estudio, ya que formaron un grupo (grupo D) los aislados obtenidos de insectos (*S. frugiperda*, *S. piceifrons* y *M. murinus*).

En cambio, Freed *et al.* (2014), analizaron mediante marcadores RAPD 62 aislados de *Metarhizium* obtenidos de suelos de diversos ecosistemas de diferentes orígenes geográficos, los resultados indicaron un polimorfismo significativo; similarmente como lo presentado en el presente estudio, ya que la mayoría de los aislados de suelo formaron el grupo más numeroso (Grupo A) conformado por 20 aislados de diferentes agroecosistemas (limón, toronja, caña de azúcar y mango) y cinco aislados de insectos (*D. saccharalis* y *D. magnifactella*).

Existen varios estudios en donde se ha demostrado la existencia de una alta diversidad genética de especies de *Metarhizium* presentes en agroecosistemas (Bidochka *et al.*, 2001; Wyrebeck *et al.*, 2011; Schneidet *et al.*, 2012; Steinwender *et al.*, 2014; Botelho *et al.*, 2019), los cuales concuerdan con los resultados del presente estudio, en donde se demostró la presencia de una diversidad genética entre los aislados de *Metarhizium* obtenidos de los diferentes agroecosistemas.

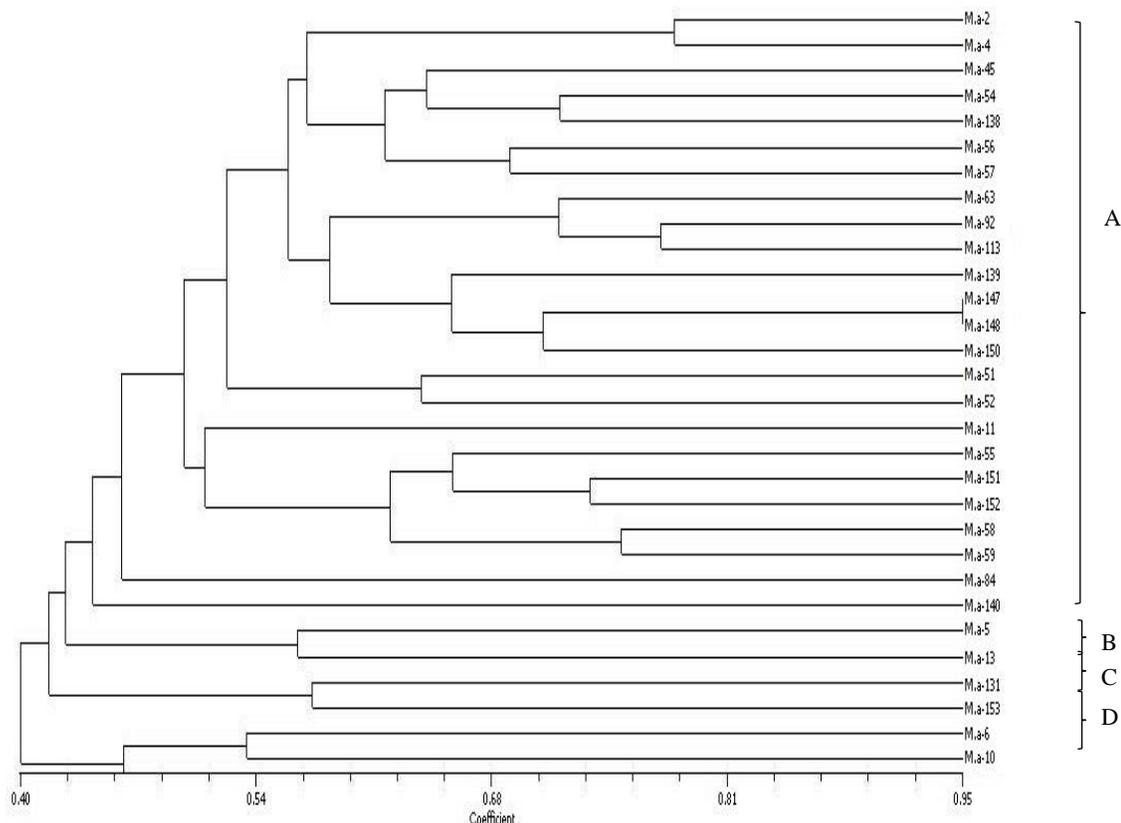


Figura 3. Dendrograma basado en el análisis de marcadores RAPD de 31 aislamientos de *Metarhizium*, empleando el coeficiente Jaccard. El UPGMA generó cuatro grupos definidos (A, B, C y D).

El conocimiento sobre la distribución natural, la diversidad genética y la estructura comunitaria de las especies de *Metarhizium* de agroecosistemas y de insectos, permite seleccionar cepas nativas y mejor adaptadas a los agroecosistemas y con ello mayor probabilidad de éxito dentro de los programas de control biológico de plagas específicas (Eilenberg *et al.*, 2001; Meyling y Eilenberg, 2007; Botelho *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que los análisis de los marcadores RAPD fueron altamente informativos y polimórficos, los cuales permitieron determinar la diversidad genética entre los aislamientos de *Metarhizium* aislados de diferentes insectos y agroecosistemas, lo que genera una aportación sobre el hábitat que permitirá desarrollar estrategias para llevar a cabo un adecuado control biológico de insectos plagas de interés agrícola.

Agradecimientos

Merary Nataly Ramírez-Milanes, agradece a la Universidad de Colima por el apoyo brindado durante el presente estudio.

Financiamiento. Se agradece el apoyo de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima.

Conflicto de intereses: Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses relacionados con esta publicación.

Cumplimiento de estándares de ética. Por su naturaleza, el presente trabajo no requirió aprobación por comité de bioética.

Disponibilidad de datos: La información del presente estudio estarán disponible por el Dr. Gilberto Manzo-Sánchez, autor para correspondencia (gmanzo@ucol.mx), con previa solicitud.

REFERENCIAS

- Becerra-Velásquez, V., Paredes Cárcamo, M., Rojo Meriño, C., France Iglesias, A., and Franco Durán, J., 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and Molecular Biology*, 30, pp. 89-99. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000100017>
- Bidochka, M. J., McDonald, M.A., St. Leger, R. J. and Roberts, D.W., 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*, 25, pp. 107 - 113. <https://doi.org/10.1007/BF00309534>
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M., Lavender, T.M., Dekoning, J. and De Croos, J.N.A., 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp. 1335 - 1342. <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.67.3.1335-1342.2001>
- Botelho, A.B.R.Z., Alves-Pereira, A., Colonhez Prado, R., Zucchi, M.I. and Delalibera, I.J., 2019. *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. *Fungal Ecology*, 41, pp. 289-300. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.07.004>
- Brunner-Mendoza, C., del Rocío Reyes-Montes, M., Moonjely, S., Bidochka, M.J. and Toriello, C., 2018. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science Technology*, 29, 83e102. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1531111>
- Cobb, B. D. and Clarkson, J. M., 1993. Detection of molecular variation in the insect pathogenic *Metarhizium* using RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 112, pp. 319 - 324. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06469.x>
- Driver, F., Milner, R.J. and Trueman, J.W.H., 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104, pp. 134 - 150. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001756>
- Eilenberg, J., Hajek, A. and Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46, pp. 387-400. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
- Entz, S. C., Johnson, D.L. and Kawchuk, L. M., 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycological Research* 109, pp. 1302 - 1312. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003746>
- Fegan, M., Manners, J.M., Maclean, D.J., Irwin, J.A.G., Samuels, K.D.Z., and Holdon D.G., 1993. Random amplified polymorphic markers reveal high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Genetics Microbiology*, 13, pp. 2075 - 2081. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-9-2075>
- Freed, S., Feng-Liang, J., and Shun-Xiang, R., 2014. Intraspecific variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* by RAPD Markers. *International Journal of Agriculture & Biology*, 16, pp. 899-904. <https://doi.org/10.13140/RJ.2014.16.5.899-904>
- Fungaro, M.H.P., Vieira, M.L.C., Pizzirani-Kleiner, A.A. and Azevedo, J.L., 1996. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. *Letter Applied Microbiology*, 22, pp. 389 - 392. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01186.x>
- Hu, G. and St Leger, R.J., 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp. 6383-6387. <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.68.12.6383-6387.2002>
- Hughes, W.O.H., Thomsen, L., Eilenberg, J. and Boomsma, J.J., 2004. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85, pp. 46 - 53. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.005>
- Iwanicki, N.S., Alves Pereira, A., Riguetti Zanardo Botelho, A.B., Rezende, J.M. Andrade Moral, R., Zucchi, M.I. and Delalibera Júnior, I., 2019. Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed

- high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. *Nature Scientific Report*, 44, pp. 4433. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38594-8>
- Leal, S.C.M., Bertioli, D.J., Butt, T.M. and Peberdy, J.F., 1994. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. *Mycological Research*, 98, pp. 1077 - 1081. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80436-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80436-X)
- Meyling, N.V. and Eilenberg, J., 2007 Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43, pp. 145–55. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>
- Navarro-Barranco, H., Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M.R., Duarte-Escalante, E. and Toriello, C., 2019. Phenotypic and molecular analysis of Mexican *Metarhizium anisopliae*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, pp. e902643. <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2643>
- Oulevey, C, Widmer, F., Kolliker, R. and Enkerli, J., 2009. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. *Mycological Research*, 113, pp. 1016 - 1024. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.005>
- Riguetti Zanardo Botelho, A.B., Alves-Pereira, A., Colonhez Prado, R., Zucchi, M.I., and Delalibera Júnior, I., 2019. *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. *Fungal Ecology*, 41, pp. 289-300. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.07.004>
- Schneider, S., Widmer, F., Jacot, K., Kölliker, R. and Enkerli, J., 2012. Spatial distribution of *Metarhizium* clade 1 in agricultural landscapes with arable land and different semi-natural habitats. *Applied Soil Ecology*, 52, pp. 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.007>
- Steinwender, B.M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J., Thorup-Kristensen, K. and Meyling, N.V., 2014. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *Journal of Invertebrate Pathology*, 123, pp. 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.09.002>
- Vega, F.E., 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, 110, 4e30. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1418578>
- Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R.K., and Bidochka, M.J., 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology*, 157, pp. 2904–2911. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051102-0>